



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Plectin Isoform 1c: Charakterisierung der aminoterminalen Tubulin
Bindungsstelle sowie Analyse der subzellulären Lokalisation in
Melanocyten.

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasser:	Alexander Ertl
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Genetik und Mikrobiologie (A441)
Betreuer:	O. Univ.-Prof. Dr. Gerhard Wiche

Wien, im Juli 2010

Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menscheist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.

Max Planck (1858-1947)

Danksagung:

Viele Menschen haben zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen, an dieser Stelle soll all diesen Leuten der ihnen gebührende Dank ausgesprochen werden.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Gerhard Wiche danken, der mir dieses interessante Thema und meinen Arbeitsplatz während meiner Diplomarbeit zur Verfügung gestellt hat und stets Zeit für mich hatte, wenn bei der Arbeit Schwierigkeiten auftraten.

Besonderer Dank gilt Dr. Gernot Walko, der mich während meiner gesamten Diplomarbeitszeit betreute, von dem ich den Großteil der für diese Arbeit relevanten Techniken erlernte und der nicht zuletzt während dieser Zeit ein geschätzter Freund geworden ist.

Auch alle Kollegen sollen hier erwähnt werden, die mit ihrer Erfahrung und freundlichen Art ein Klima geschaffen haben, das angehende Wissenschaftler ermutigt, neue und eigene Ideen zu verfolgen und unter Anleitung erfahrener Leute zu einem erfolgreichen Ende zu führen.

Hervorheben möchte ich hier Dr. Lubomir Janda und Mag. Július Košťan, die mich stets unterstützten und mir mit ihrer Erfahrung zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die das soziale und finanzielle Umfeld geschaffen haben, ohne das die gesamte Arbeit nie möglich gewesen wäre. Speziell möchte ich an dieser Stelle meine Frau erwähnen, die all meine Probleme und Hoffnungen mit mir geteilt hat und mir zu jeder Zeit eine Stütze war.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	- 5 -
1.1.	Cytoskelett	- 5 -
	Intermediärfilamente	- 6 -
	Actinfilamente	- 7 -
	Mikrotubuli	- 9 -
	Cytolinker und Plakine	- 10 -
	Plectin	- 13 -
	Plectin-Mutationen als Ursache humaner Erbkrankheiten	- 15 -
1.2.	Melanocyten, Melanosomen und Transport	- 15 -
	Der Melanosomen-Transportkomplex	- 17 -
	Myosin	- 18 -
	Rab27	- 19 -
	Melanophilin	- 19 -
1.3.	Ziele der Diplomarbeit	- 20 -
2.	MATERIAL UND METHODEN	- 21 -
2.1.	Biochemie-Proteine	- 21 -
	Bestimmung der Proteinkonzentration	- 21 -
	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	- 21 -
	Coomassiefärbung und Trocknen von PA-Gelen	- 22 -
	Western Blot Analyse	- 23 -
	Quantitative Bestimmung von Proteinbanden	- 25 -
	Strippen von Nitrozellulosemembranen	- 25 -
	Herstellung von Zelllysaten	- 25 -
	Aufreinigung von Tubulin aus Schweinegehirn	- 26 -
	MT-Cosedimentation	- 28 -
	Verwendete Plectinfragmente	- 28 -
	Ablauf	- 28 -
	Elektronenmikroskopie (Negativ-Färbung)	- 29 -
	Immunofluoreszenz Mikroskopie	- 30 -
2.2.	Zellkultur	- 32 -
	Verwendete Zelllinien	- 32 -
	Auftauen von Zellen	- 32 -
	Kultivierung der Zelllinien	- 32 -
	Differenzierung von B16F10 Zellen	- 33 -
	Subzelluläre Fraktionierung von Melanomazellen	- 33 -
3.	ERGEBNISSE	- 35 -
3.1.	Plectin – Melanosomen Interaktion	- 35 -
	Analyse der Proteinexpression von Plectin 1c und Myosin Va in B16F10 Zellen	- 35 -
	Unterschiedliche Expression der Plectin-Isoformen 1c und 1 unter verschiedenen Kulturbedingungen	- 36 -
	Zelluläre Verteilung von Plectin 1c in B16F10 Zellen	- 37 -
	Cosedimentation von Plectin 1c mit Melanosomen	- 44 -
3.2.	Interaktion des N-Terminus von Plectin mit Tubulin/MT	- 46 -
	Ist die vom Plectin Exon 1c kodierte Aminosäuresequenz direkt für die Interaktion mit MT verantwortlich?	- 46 -
	Die von Plectin-Exon 1c kodierte AS-Sequenz vermittelt alleine keine spezifische Bindung an MT.	- 47 -
	Die Plectin-Isoform 1c-spezifische ABD bindet nicht an Tubulin-Protofilamente.	- 52 -
		- 3 -

Alternatives RNA-Splicing in neuronal Geweben generiert eine Plectin-Isoform 1c-spezifische ABD mit
MT-Bindungseigenschaften. - 53 -

4.	DISKUSSION	- 58 -
4.1.	Subzelluläre Lokalisation von Plectin 1c in Melanocyten	- 58 -
	Interaktion von Plectin 1c mit Melanosomen	- 58 -
4.2.	P1c-MT-Bindung	- 59 -
5.	ZUSAMMENFASSUNG	- 61 -
6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 63 -
7.	REFERENZEN	- 65 -
8.	ABKÜRZUNGEN	- 75 -
9.	LEBENS LAUF	- 76 -

1. Einleitung

1.1. Cytoskelett

Die eukaryotische Zelle ist eine komplexe eigenständige Einheit mit einer hoch entwickelten inneren Struktur, dem Cytoskelett, welches es der Zelle ermöglicht, die vielseitigen Anforderungen, die an sie gestellt werden, zu bewältigen. Einige Aufgaben des Cytoskeletts sind die Fortbewegung, die Erhaltung der Zellform und der intrazelluläre Transport. Das Cytoskelett besteht hauptsächlich aus drei Filament-Systemen: Actin- bzw. Mikrofilamente, Intermediärfilamente (IF) und Mikrotubuli (MT). Die Abbildung 1 zeigt ein Modell, in dem die oben genannten Filamentsysteme entsprechend ihres Vorkommens in der Zelle dargestellt werden. Eine wichtige Eigenschaft aller drei cytoskelettären Filamentsysteme ist die Fähigkeit hochdynamische Strukturen zu bilden, die sich aus kleinen Untereinheiten zusammensetzen. Diese Eigenschaft erlaubt es allen drei Filamentsystemen, sich rasch auf die stets wechselnden äußeren Bedingungen einzustellen.

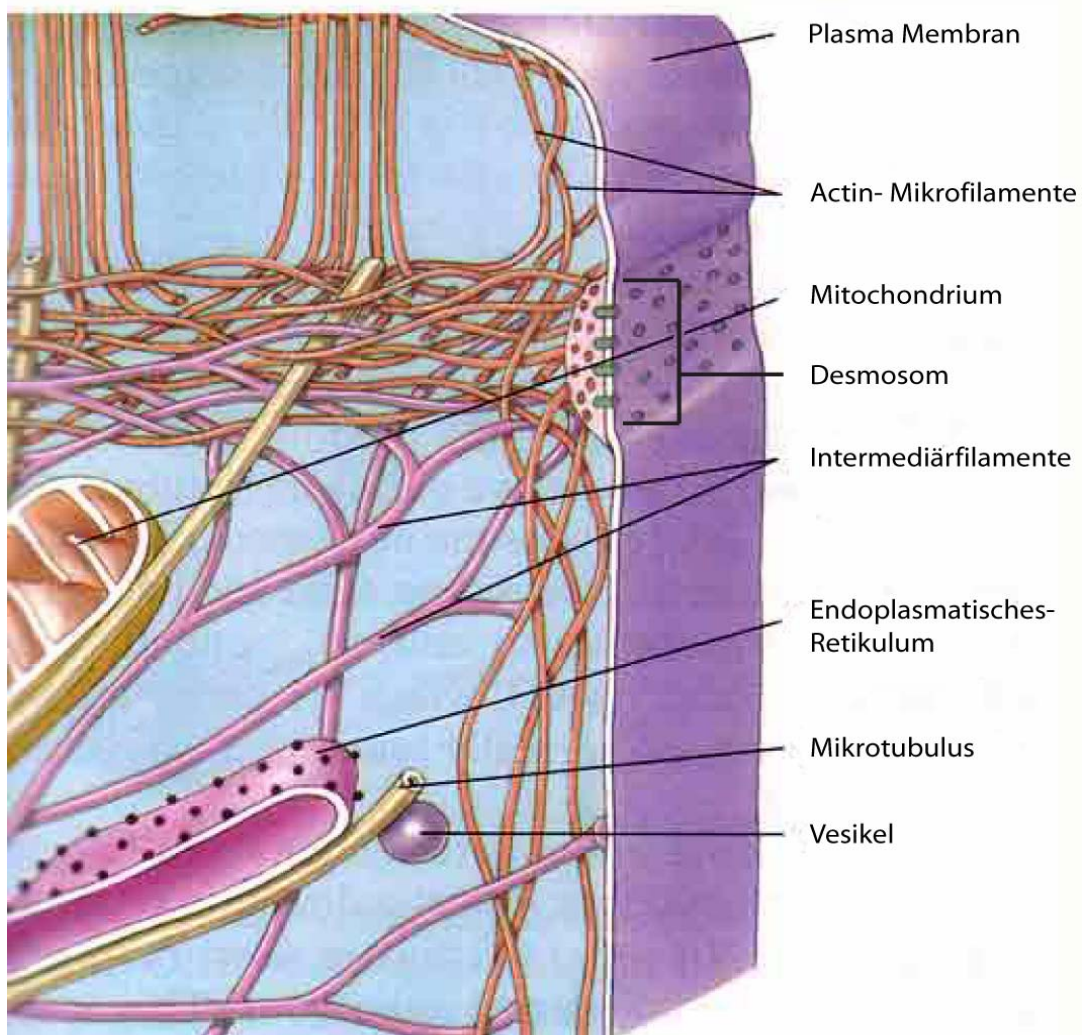


Abbildung 1. Das Cytoskelett in Eukaryotenzellen.

Die Abbildung zeigt, wie die drei cytoskelettalen Filamentsysteme der eukaryotischen Zelle typischerweise verteilt sind. Des Weiteren ist die Assoziation von Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum, sowie membranösen Vesikel mit Mikrotubuli dargestellt (Audesirk et al., *Biology*, Prentice Hall, 1999).

Intermediärfilamente

Intermediärfilamente (IF) wurden in den späten 1960er Jahren von Holtzer und Kollegen bei Untersuchungen des Skelettmuskels entdeckt (*Ishikawa et al., 1968*). IF kommen in allen höheren Metazoen sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma vor (*Erber et al., 1998*). Sie verleihen der Zelle Stabilität und Widerstand gegen Scherkräfte. Dieses Filamentsystem ist sehr variabel und variiert je nach Zelltyp in der Komposition seiner Untereinheiten. Die cytoplasmatischen IF sind mit den Kernlaminen sehr eng verwandt. IF wurden in fünf Typen oder Sequenz-Homologie-Klassen (sequence homology classes, SHC) auf Basis der Aminosäuresequenz eingeteilt (*Fuchs et al., 1994*). Die sauren Keratine werden als Typ 1, die basischen Keratine als Typ 2 zusammengefasst. Vimentin, Desmin und saures Glialfaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) bilden den Typ 3, die Neurofilamente den Typ 4 und die Kernlamine den Typ 5. Rein funktionell können IF nach Art ihrer Assemblierung in drei Gruppen eingeteilt werden: Keratine, vimentinartige IF und Lamine. Diese drei Gruppen assemblieren in derselben Zelle nicht zu gemischten Filamenten, sondern bilden vielmehr voneinander getrennte Strukturen aus (*Houseweart et al., 1998*).

Der prinzipielle strukturelle Aufbau der IF ist im Allgemeinen gleich. Die globulären N- und C-terminalen Enden sind durch eine zentrale α -helicale Domäne verbunden. Variationen der Aminosäuresequenz treten hauptsächlich in den globulären Domänen auf, während der α -helicale Teil bei allen Isoformen ähnlich ist. In der α -helicalen Rod-Domäne sind die Aminosäuren in Wiederholungen von Blöcken aus sieben Aminosäuren organisiert (*Seyun et al., 2007, Herrmann et al., 2009*). Keratine, vimentinartige IF und Lamine unterscheiden sich auch in der Art der Filamentassemblierung. Da der Filamentbildungsmechanismus von Vimentin und Desmin am besten verstanden ist, soll er an dieser Stelle als Beispiel für die Assemblierung eines IFs dienen. Die Assemblierung der Vimentin Filamente gliedert sich in 3 Phasen (*Herrmann et al., 2009*). Noch vor Beginn der Phase 1 lagern sich parallel orientierte Homodimere versetzt aneinander und bilden so ein apolares Tetramer. In Phase 1 lagern sich diese Tetramere lateral aneinander, um so genannte Einheitslängen-Filamente (unit length filament, ULFs) zu bilden. In Phase 2 werden die ULFs aneinander gehängt, um eine seilartige Struktur zu bilden, die dann in Phase 3 noch einmal radial verdichtet wird.

Das fertige, seilartige Filament misst ungefähr 11 nm im Durchmesser (*Franke et al., 1978; Herrmann et al., 1998, Georgakopoulou et al., 2009*). Über Regulationsmechanismen des Auf- und Abbaus von IF ist weniger bekannt, als bei Actinfilamenten und MT. Unter normalen Bedingungen wird der Abbau vermutlich über Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen reguliert, wie z.B. bei den Kernlaminen während der Mitose.

Versuche in Zellkulturen haben gezeigt, dass die Injektion von Peptiden die nur aus der α -helicalen Domäne der IF bestehen, zum Abbau von Actinfilamenten und MT führen kann, was für eine enge Quervernetzung der drei Filamentsysteme spricht. Des Weiteren haben Versuche in Epithelzellen gezeigt, dass für den ins Zellinnere gerichteten Transport von Keratin-Filamentvorläufern nicht MT, sondern Actinfilamente wichtig sind (*Werner et al., 2004, Kölsch et al., 2009*). Während der Einsatz von Nocodazol die Tubulinpolymerisation blockierte, blieben die Bildung und der ins Zellinnere gerichtete Transport von Keratinpartikeln aufrecht. Jedoch war eine stärkere Bündelung der Keratinfilamente zu beobachten. Im Gegensatz dazu kam es bei Actindepolymerisation mittels Latrunculin B oder Cytochalasin D zum Stopp der Bildung von Keratinpartikeln in der Zellperipherie und zum Erliegen des zum Zellinneren hin gerichteten Transportes.

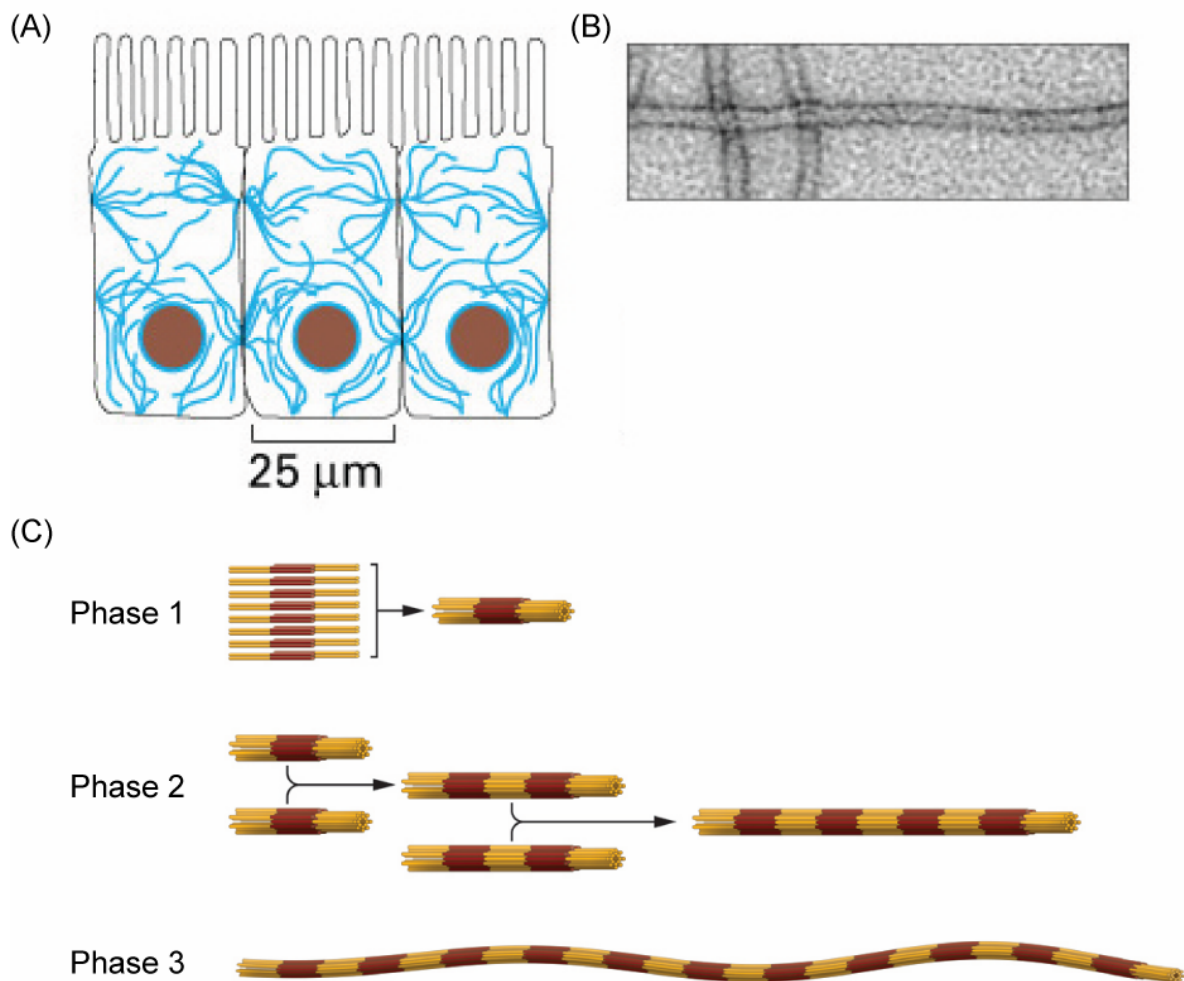


Abbildung 2. Intermediärfilamente.

(A) Zellen im epithelialen Verband mit einer für diesen Zelltyp typischen IF Verteilung um den Kern und als stützendes Netzwerk im Cytoplasma. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von IF (Alberts, B et al., „Molecular Biology of the Cell“ 2004).. (C) Darstellung der Assemblierung eines Vimentin IF (Kirmse et al., 2007) leicht verändert. Vor Phase 1 lagern sich polare Dimere versetzt aneinander und bilden so apolare Tetramere. In Phase 1 lagern sich diese Tetramere lateral aneinander, um so genannte ULFs (Unit-length filaments) zu bilden. In Phase 2 werden die ULFs aneinandergehängt, um eine seilartige Struktur zu bilden. Diese Struktur wird in Phase 3 noch einmal verdichtet und bildet das fertige Filament.

Actinfilamente

Actinfilamente, welche auch als Mikrofilamente bezeichnet werden, legen die Form der Zelloberfläche fest und sind für die Zellmigration und das Anhaften am Substrat erforderlich. Actinfilamente (F-Actin) sind zweisträngige helicale Polymere, die aus dem globulären Monomer G-Actin bestehen und Fasern von 5-9 nm Durchmesser bilden. In der Zelle formen sie abhängig vom jeweiligen Zustand und der zellulären Funktion bestimmte Strukturen wie zum Beispiel Lamellipodien, Filopodien oder Stressfasern aus, erreichen ihre höchste Dichte jedoch im Zellcortex, unmittelbar unter der Plasmamembran (Lang et al., 2000; Alberts, B et al., „Molecular Biology of the Cell“ 2004). Da die Actin-Monomere eine Polarität aufweisen, kann man beim Actin-Filament ein Plus- und ein Minusende unterscheiden. Gerade beim Auf- und Abbau der Actinfilamente spielt diese Polarität eine entscheidende

Rolle (Wegner *et al.*, 1976). Actinfilamente bilden in der Zelle unterschiedliche Strukturen aus und können durch Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinen eine Vielzahl von Funktionen erfüllen. Exemplarisch sollen hier die Lamellipodien, Filopodien und Stressfasern genannt werden.

Lamellipodien sind Ausstülpungen der Zellmembran, sind flach und breit angelegt und dienen der Zelle zur Fortbewegung durch Anhaftung ans Substrat und als Ruffles zur Phago- und Pinocytose (J. Small *et al.*, 2002). In Lamellipodien sind die schnell wachsenden Enden (Plusenden) der Filamente zur Membran hin orientiert, während die langsam wachsenden Enden (minus Enden) zum Zellinneren hin ausgerichtet sind (Atilgan *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu Strukturen wie Filopodien sind hier jedoch die Actinfilamente nicht gebündelt.

Filopodien sind Teile der Lamellipodien, doch durch die gebündelten Actinfasern unterscheiden sie sich strukturell vom restlichen Lamellipodium und stehen über die eigentliche Front des Lamellipodiums (genannt Führungskante) hinaus. (siehe Abbildung 3) (C. Revenu *et al.*, 2004). Filopodien dienen vor Allem den Zellen zur Erkundung der Umgebung. Ob Actinfilamente gebündelt oder mit lockerer, gelartiger Struktur auftreten, hängt von den Proteinen ab, die mit den Actinfasern interagieren. Einige dieser Proteine sind: Fimbrin, α -Actinin, Villin, Fascin und Filamin. Während Actin in Filopodien zusammen mit α -Actinin Filamentbündel bildet, formt es bei Interaktion mit Filamin verzweigte Strukturen (C. Revenu *et al.*, 2004).

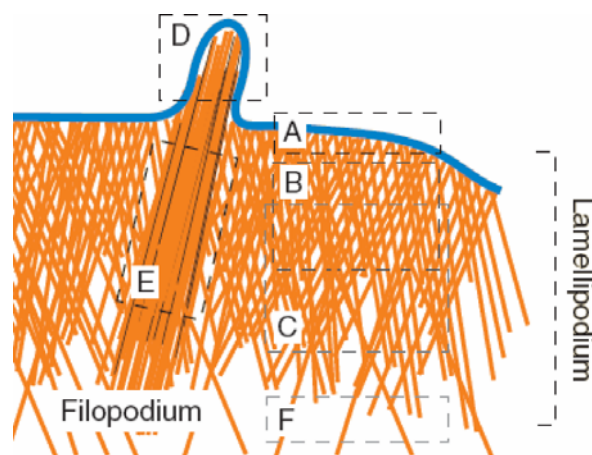


Abbildung 3. Actinstrukturen in der eukaryotischen Zelle.

Schematische Darstellung der verschiedenen Regionen in Lamellipodien und Filopodien:

(A) Führungskante des Lamellipodiums; (B) Actinnetzwerk; (C) Region mit hoher Depolymerisationsrate; (D) Spitze des Filopodiums; (E) Actinbündel; (F) Intaktes Filament, das Bestandteil des cytoplasmatischen Netzwerkes ist. (J. Small *et al.*, 2002).

Eine weitere aus Actin bestehende Struktur die hier eingehender diskutiert werden soll, sind die Stressfasern: Im Gegensatz zu den oben erwähnten Strukturen (Filopodium und Lamellipodium) sind die Plus- und Minusenden der Actinfilamente, hier nicht in eine Richtung, sondern entgegengesetzt orientiert. In den Stressfasern ist Actin in kontraktile Bündeln organisiert und mit α -Actinin assoziiert (Lazarides *et al.*, 1975, Pellegrin *et al.*, 2007). Die viel lockerere Packung der kontraktile Bündel im Vergleich zu den parallelen Bündeln der Filopodien erlauben dem Motorprotein Myosin II aktiv zu werden, während es in den dicht gepackten parallelen Bündeln der Filopodien ausgeschlossen bleibt (Alberts, B *et al.*, „Molecular Biology of the Cell“ 2004). Daher sind Filopodien im Gegensatz zu Stressfasern nicht kontraktile. Die Stressfasern enden meistens in Fokalkontakten und können durch Ihre Fähigkeit zur Kontraktion auf diese Art Zugkräfte auf die Umgebung ausüben (Hotulainen *et al.*, 2006).

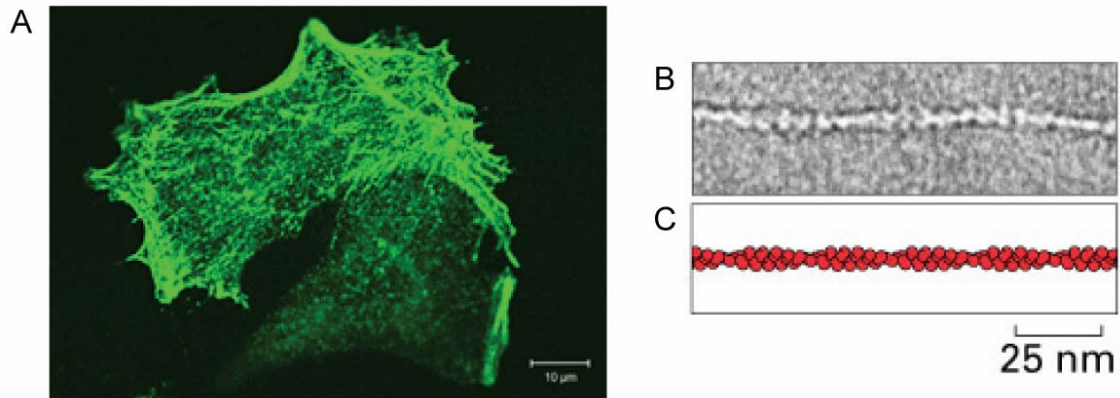


Abbildung 4. Actinfilamente.

(A) Actinverteilung in einer undifferenzierten B16F10 Melanomazelle. Kortikale Regionen weisen die höchste Dichte an Actinfilamenten auf. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Actinfilaments. (C) Schema eines typischen Actinfilaments. (Alberts *et al.*, 2004).

Mikrotubuli

Mikrotubuli haben in Zellen verschiedene wichtige Funktionen, wie zum Beispiel die Ausbildung der Mitosespindel bei der Zellteilung, die Ausbildung von Cilien und Flagellen, sowie das Bereitstellen von „Transportwegen“ im intrazellulären Transport. MT sind Hohlzylinder mit einem Durchmesser von 25 nm, die aus dreizehn parallel angeordneten Protofilamenten bestehen. Im Gegensatz zu den Actin Monomeren (G-Actin) besteht eine Tubulin-Grundeinheit aus einem Heterodimer aus α - und β -Tubulin (Downing *et al.*; 1998). Diese zwei Tubulin Untereinheiten alternieren längs eines Protofilaments und bilden somit eine polare Struktur mit einem Minus-Ende mit α -Tubulin (langsam wachsend) und einem Plus-Ende mit β -Tubulin (schnell wachsend) (Alberts, B *et al.*, „Molecular Biology of the Cell“ 2004). Da die α -Tubulin Untereinheiten eines Protofilaments mit den α -Tubulin Untereinheiten der benachbarten Protofilamente eingehen, ebenso wie die β -Untereinheiten mit den nächsten β -Tubulin Untereinheiten, sind Mikrotubuli stabile Strukturen. In der Zelle sind die Minus-Enden der Mikrotubuli meist an einem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (microtubule organizing center, MTOC) verankert, wo sie auch stabilisiert werden, während die schnell wachsenden Plusenden durch Polymerisation durch Anheftung GTP-gebundener Tubulin Moleküle wachsen können (Alberts, B *et al.*, „Molecular Biology of the Cell“ 2004).

Hoch spezialisierte Proteine, so genannte Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAPs) können MT durch ihre Bindung stabilisieren, beziehungsweise destabilisieren. Die ersten MAPs wurden ursprünglich aus Gehirngewebe-Extrakten bei der Aufreinigung von Tubulin cosedimentiert (Borisy *et al.*, 1975). Es existieren verschiedene Klassen von MAPs, die grob in enzymatisch aktive, MT Plusende assoziierte, Zentrosom assoziierte, MT Motoren und strukturelle MAPs unterteilt werden können. MT-Motor Proteine sind unter anderem die Dyneine und Kinesine. Diese Proteine sind in der Lage, unter Aufwendung der Energie von ATP-Hydrolyse entlang der MT zu wandern (Brokaw *et al.*, 1997). Als Beispiel für die strukturellen MAPs sollen die Proteine der MAP2/Tau Familie erwähnt werden, die wie auch die MAP1A/1B Familie eine der „klassischen“, gut charakterisierten, strukturellen Familien

bilden (Halpain and Dehmelt, 2006, Dehmelt and Halpain, 2005). Die MAP2 Proteine besitzen eine carboxyterminale Domäne mit mehreren MT Bindungsmotiven, während das aminoterminal Ende der Proteine vom Mikrotubulus abstehende Arme mit einer weiteren MT-Bindungsdomäne bildet, die vermutlich in der Regulation und der räumlichen Verteilung von Mikrotubuli eine Rolle spielen. Tau Proteine sind den MAP2 Molekülen sehr ähnlich, bilden jedoch zwischen den N- und C-Terminalen Tubulinbindungsdomänen Schleifen aus und formen somit im Gegensatz zu den MAP2-Peptiden keine abstehenden Arme (Alberts, B et al., „Molecular Biology of the Cell“ 2004). Diese strukturellen Unterschiede sorgen für ein unterschiedliches räumliches Verteilungsmuster in Zellen (Chen et al., 1992). MAPs sind das Ziel mehrer Proteinkinasen, die aus dieser Interaktion resultierende Phosphorylierung der MAPs ist ein Regulationsmechanismus für die Verteilung und den Zustand der MAPs in der Zelle. Als Beispiel hierfür kann die phosphorylierungsabhängige Assoziation von MAP2c und Actin genannt werden. Auf MAP2c Phosphorylierung durch cAMP-abhängige Kinase hin wird die Mikrotubuli-MAP2c Interaktion gelöst und MAP2c bindet an Actinfilamente peripherer Membran Ruffles. (Ozer und Halpain, 2000).

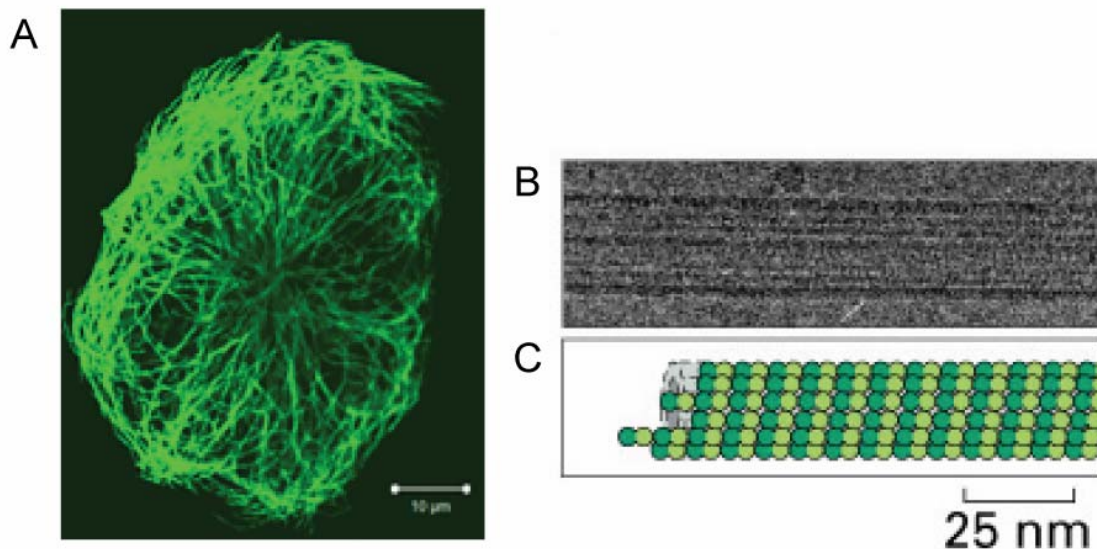


Abbildung 5. Mikrotubuli.

(A) Typische Mikrotubulianordnung in undifferenzierter B16F10 Melanomazelle. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mikrotubulus (Einzelne Substrukturen (die so genannten Protofilamente sind sichtbar). Schematische Darstellung eines Mikrotubulus mit den einzelnen, leicht versetzten Protofilamenten und den farblich unterschiedenen α - und β -Monomeren (Alberts, B et al., „Molecular Biology of the Cell“ 2004).

Cytolinker und Plakine

Manche zellulären Prozesse wie zum Beispiel die Fortbewegung benötigen ein koordiniertes Zusammenspiel der verschiedenen Filamentsysteme. Bei diesen Abläufen spielen die so genannten Cytolinker Proteine eine entscheidende Rolle.

Plakine oder Cytolinker sind eine Familie von cytoskelettären linker-Proteinen, die mit Bestandteilen des Cytoskeletts und Zell-Zell-Verbindungskomplex assoziieren (Jefferson et al., 2004, Jefferson et al., 2007). Es wurden bisher sieben Familienmitglieder identifiziert (Conrad L. Leung et al., 2002): Desmoplakin, Envoplakin, Periplakin, Epiplakin, Plectin, BPAG1 (bullous

pemphigoid antigen 1) und MACF (microtubule-actin crosslinking factor). Die Mitglieder der Plakinfamilie besitzen einen generell ähnlichen Bauplan, der jedoch von Protein zu Protein leicht variiert. Die meisten Plakine werden als multiple, gewebsspezifische Isoformen exprimiert (*Brown et al., 1995, Bernier et al., 1996*). Eine interessante Eigenschaft der Plakine ist, dass die Isoformen genau auf die Anforderungen der spezialisierten Zellen maßgeschneidert sind (*Fuchs et al., 1997, 1999*). Alle Plakine besitzen eine modulare Struktur und sind aus einer Kombination der folgenden Domänen aufgebaut:

1. Actin-Bindungsdomäne (AB): Diese Domäne besteht aus 2 Calponin-Homologie-Domänen (CH) und ist im Aufbau den AB der Spectrinfamilie sehr ähnlich. Durch die Familie der Plakine hindurch sind die AB-Domänen durch alternatives Spleißen sehr variabel. In einigen Fällen ist nur eine CH Domäne vorhanden und somit nicht mehr fähig, an Actin zu binden. Bei allen Mitgliedern der Plakin Proteinfamilie die eine AB-Domäne aufweisen, ist diese am N-Terminus angesiedelt.

2. Plakin-Domäne: Alle Plakin Familienmitglieder mit Ausnahme von Epiplakin enthalten eine Plakin-Domäne. Sie besteht aus sechs α -Helicalen Segmenten (NN, Z, Y, X, W und V), die in einem antiparallelen α -helicalen Bündel organisiert sind (*Sonnenberg et al., 2007*). Die Funktion der Plakin-Domäne ist nicht ganz geklärt, dient aber bei einzelnen Familienmitgliedern dazu, die Proteine an spezifische Zell-Zell Kontakte zu dirigieren (Desmoplakin zu Desmosomen, Plectin und BPAG1 zu Hemidesmosomen) (*Koster et al., 2003*). Plakin-Domänen sind, wenn vorhanden, zwischen der AB und der α -helicalen coiled-coil Domäne am N-Terminus lokalisiert. Bei allen Plakinen bis auf Epiplakin wird diese Domäne von einer SH3-Domäne durchbrochen. Im Fall von Plectin und Dystonin ist N-terminal von der SH3 Domäne ein PxxP Motiv zu finden, welches eine konservierte Zielsequenz der meisten SH3 Domänen Liganden ist. Somit könnte diese Protein-Protein Interaktionsdomäne in Plectin durch Intramolekulare Inhibition für andere Bindungspartner nicht frei zugänglich sein.

3. Coiled-Coil Rod Domäne: Diese Domäne vermittelt die Homodimerisation zweier Plakinmoleküle, in paralleler Orientierung vermittelt (*Ruhrberg und Watt, 1997*). Im Falle von Plectin stellt diese Domäne die Verbindung zwischen den N- und C-terminal gelegenen, globulären Domänen dar (*Wiche et al., 1991*).

4. Plakin-Repeat-Domäne: Diese Region besteht aus unterschiedlich vielen homologen Domänen. Die Zahl der Domänen variiert von Null in Periplakin bis dreizehn in Epiplakin. Man kann zwischen A, B und C Repeat-Domänen unterscheiden. Der grundlegende Aufbau eines Plakin-Repeat-Domänen-Bausteins besteht aus 38 Aminosäuren, die eine β -Haarnadel und zwei α -Helices ausbilden (*Janda et al., 2001; Choi HJ et al., 2002*). Die Plakin-Repeat-Domäne kann IF binden, obwohl noch nicht geklärt ist, wann und unter welchen Bedingungen, welcher IF-Subtyp gebunden wird. Sowohl für Plectin (*Nikolic et al., 1996*) als auch Desmoplakin (*Fonato et al., 2002*) konnte gezeigt werden, dass die Verbindungsdomäne direkt mit IF interagieren kann. Ein Sequenzvergleich zwischen der Plectin Verbindungsdomäne und der Desmoplakin Verbindungsdomäne hat eine Homologie von 70% gezeigt (*Fonato et al., 2002*).

5. Spectrin-Repeat-Domäne: Diese Domäne ist, wie der Name besagt, charakteristisch für die Spectrin-Proteinfamilie (Dystrophin, α -Actinin und Spectrine) und verleiht diesen Proteinen die Fähigkeit, antiparallel zu dimerisieren. Dystrophin, welches 24 dieser Spectrin-Repeats besitzt, tritt als Ausnahme trotz dieser Domänen als Monomer auf. Jede einzelne der

Regionen besteht aus drei α -Helices, die durch zwei unstrukturierte Schleifenbereiche verbunden werden (Djinovic-Carugo *et al.*, 2000).

6. Mikrotubuli-Bindungsdomänen: Unterschieden werden die GAR (Gas2-related Domäne), und die GSR (glycine-serine-arginine-Domäne) Domäne. Beide Regionen sind C-terminal angesiedelt. Die GSR Domäne vermittelt zum Beispiel Tubulininteraktion in BPAG1 und in MACF (Sun *et al.*, 2001).

Eine weitere typische Eigenschaft der Plakine ist es, dass von vielen Proteinfamilien-Mitgliedern durch alternatives Spleißen mehrere verschiedene Varianten des jeweiligen Proteins vorkommen. Besonders ausgeprägt ist diese Eigenschaft beim Plectin-Gen.

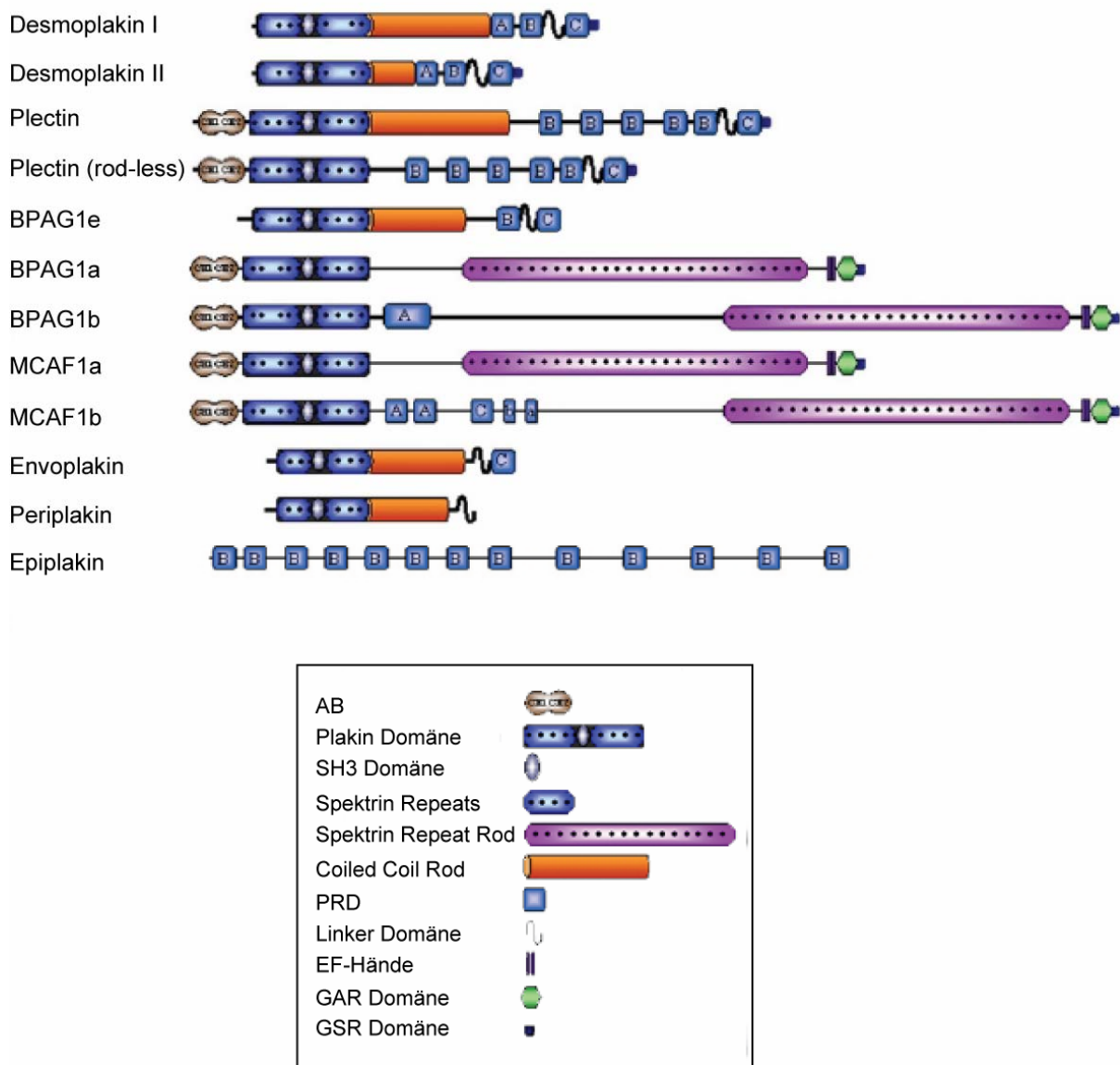


Abbildung 6. Die Plakin-Familie.

Schematische Darstellung der Vertreter der Plakin-Familie mit der jeweiligen Domänenabfolge. Die sieben funktionellen Domänen sind im Text näher erläutert. (Sonnenberg und Liem, 2007; leicht verändert).

Plectin

Entdeckt wurde Plectin ursprünglich bei Aufreinigungen von IF aus kultivierten tierischen Zellen, wo es zusammen mit den aufgereinigten IF isoliert wurde (Pytela und Wiche, 1980). Plectin wird in beinahe allen Geweben von Säugetieren exprimiert, wo es mit allen drei oben genannten cytoskeletalen Filamentsystemen interagiert. Besonders stark wird Plectin in Muskelgewebe, Epithelien, Zellen der Blut-Hirnschranke und an Gewebsschichten, welche als Grenze zu flüssigkeitsgefüllten Hohlorganen dienen, exprimiert (Rezniczek et al., 2010). Auf zellulärer Ebene findet man Plectin vor allem an Zell-Zell und Zell-Matrixkontakten. Als Beispiel hierfür kann man fokale Adhäsionskontakte von Zellen in Kultur oder auch die Interaktion von Plectin mit Integrin $\beta 4$ in Hemidesmosomen an der basalen Zellmembran von Keratinocyten in der Basalschicht von Plattenepithelien anführen (Wiche et al., 1984). In Plectin-Null Mäusen sowie in konditionellen Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Plectin kurz nach der Geburt zum Tod führt, beziehungsweise schwere Haut-, Muskel- und Herzdefekte verursacht. Die in den Plectin-defizienten Tiermodellen beobachteten Phänotypen ähneln den Symptomen von Epidermolysis Bullosa Simplex Patienten.

Als Mitglied der Plakin Familie weist auch Plectin die für Plakine typische Struktur auf. Das humane Plectin Gen ist auf dem Chromosom 8 q24 lokalisiert, in der Maus auf Chromosom 15 und besteht aus 32 Exons. Das Protein selbst ist je nach Isoform über 500 kDa groß und weist zwei globuläre Domänen am N- und C-Terminus auf, die durch eine zentrale Rod-Domäne miteinander verbunden werden (Foisner und Wiche, 1987; Wiche et al., 1991). In der N-terminalen, globulären Domäne befindet sich eine Actin-Bindungsstelle, die aus Calponinhomologie-Domänen besteht (Andrä et al., 1998; Fuchs et al., 1999) sowie eine SH3-ähnliche Domäne. Die Interaktion zwischen Plectin und MT (Herrman und Wiche 1987; Svitkina et al., 1996; Andrä et al., 2003) wird wahrscheinlich durch die Interaktion der SH3-Domäne mit MAPs vermittelt (Walko, nicht publizierte Daten). Die Rod Domäne ist in etwa 200 nm lang und weist eine α -helicale coiled-coil Struktur auf, während die C-terminale Domäne von sechs homologen Plakin-Repeats gebildet wird, wobei zwischen den Repeat-Domänen 5 und 6 die IF-Bindungsdomäne zu finden ist und einen Abschnitt von ~ 50 Aminosäuren umfasst (Nikolic et al., 1996).

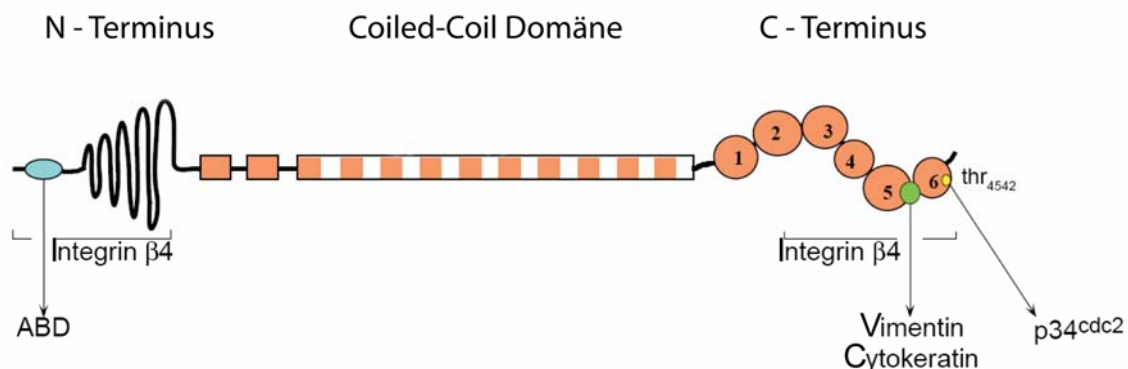


Abbildung 7. Domänenstruktur von Plectin.

Die globulären N- und C-Termini sind verbunden durch die coiled-coil Domäne. Im Einzelnen sind Bindungsstellen für andere Proteine angegeben. ABD, Actin-Bindungsdomäne. Die Intermediärfilament-Bindungsdomäne und die N- und C-terminal liegenden Integrin $\beta 4$ Bindungsdomänen sind eingezeichnet. Thr 4542 bezeichnet die Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase $p34^{cdc2}$ (Wiche et al., 1991; Review: Wiche, 1998). (leicht verändert).

Auffällig ist, dass der N-Terminus von 30 Exons codiert wird, während die Rod-Domäne und der C-Terminus von jeweils nur einem Exon codiert werden. Weiters wurden unterschiedliche Plectin Isoformen identifiziert, deren N-Terminus von unterschiedlichen ersten Exons kodiert wird. Diese Isoformen entstehen in verschiedenen Geweben durch alternatives Spleißen der ersten Exons. Mittlerweile sind 8 verschiedene Plectin Isoformen identifiziert worden, die alle ein gewebsspezifisches Expressionsmuster aufweisen (*Fuchs et al., 1999, Reznicek et al., 2003*). Gewebsspezifische RNA Vergleiche zeigten, dass die verschiedenen Plectinisformen in unterschiedlichen Zellen/Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden: Als Beispiele hierfür sollen die Plectinisform 1a in Keratinocyten (*Andrä et al., 2003*), die Plectin Isoform 1c in Hirngewebe und die Plectinisform 1d in Skelettmuskelzellen angeführt werden (*Konieczny et al., 2008*).

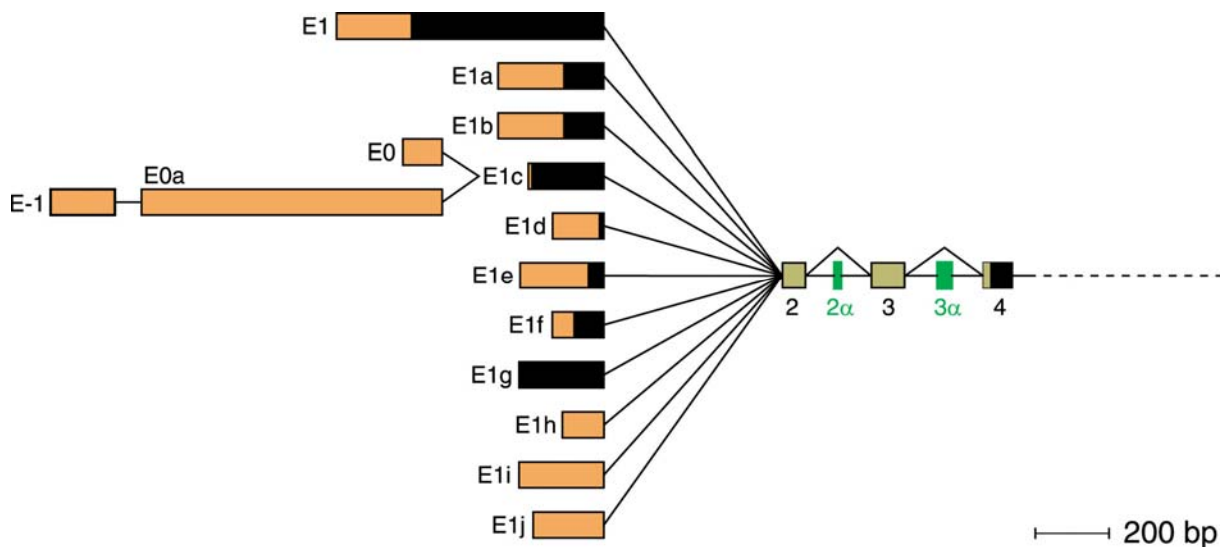


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Spleiß-Ereignisse am N-Terminus von Plectin.

Schematische Darstellung der alternativen ersten Exons am 5'-Ende des Maus-Plectin-Gens. Es existieren 11 alternative Exons, die direkt an Exon 2 gespleißt werden und 3 weitere, die nicht direkt an Exon 2 gespleißt werden. Weiters gibt es Isoformen von Plectin mit 2 alternativen Exons zwischen den 2 und 3, und 3 und 4 Exons. Acht der oben angeführten Exons sind codierende Exons (E1, E1a, E1b, E1c, E1d, E1e, E1f und E1g), drei sind nicht-codierende Exons (E1h, E1i, E1j). Weiters gibt es drei nicht codierende Exons am 5'-Ende des Exons 1c, E0 und E0a direkt an E1c und E-1 am 5'-Ende von E0a (*Fuchs et al., 1999*).

Durch seine Funktion als Cytolinker spielt Plectin auch an Zell-Zell Kontakten eine wichtige Rolle. In Epithelzellen und Epithelgewebe wurde Plectin gehäuft in desmosomalen Plaque-Regionen lokalisiert (*Eger et al., 1997*), was zu einer lateralen Verteilung von Plectin in diesen Zellen führt. Weiters wurde Plectin als essentieller Bestandteil von Hemidesmosomen der Haut gefunden (*Wiche et al., 1984, Reznicek et al., 1998*). In „Rescue-Experimenten“ konnte gezeigt werden, dass die Expression der Plectinisform 1a in Plectin-defizienten Keratinocyten zu einer Steigerung der Bildung von Hemidesmosom-ähnlichen Strukturen führt (*Andrä et al., 2003*). Weiters konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass nur die in Keratinocyten dominant auftretende Plectinisform 1a zur vermehrten Ausbildung von Hemidesmosom-ähnlichen Strukturen in Plectin-defizienten Keratinocyten führte, während Expression der Isoformen 1c und 1 dies nicht bewirkte. Plectin fungiert in Hemidesmosomen als Stabilisator und verbindet die IF der Zelle mit der Plasmamembran (*Reznicek et al., 1998; Borradori und Sonnenberg, 1999*). Mittels der N-terminalen ABD, die auch als Integrin $\beta 4$ (int $\beta 4$) Bindungsdomäne fungieren kann (*Reznicek et al., 1998*) und der C-terminalen IF Bindungsstelle, ist Plectin in der Lage Keratinfilamente am hemidesmosomalen Komplex zu verankern (*Reznicek et al., 1998, Andrä et al., 1997*).

Plectin-Mutationen als Ursache humaner Erbkrankheiten

Epidermolysis bullosa (EB) als Überbegriff steht für eine Gruppe phänotypisch unterschiedlicher Genodermatosen. Als allgemeines Diagnosemerkmal für EB gilt die typische Blasenbildung der Haut und der Schleimhäute als Konsequenz eines mechanischen Traumas. Derzeit unterscheidet man die folgenden Erscheinungsformen von EB. Die erste Form ist Epidermolysis bullosa simplex (EBS), mit intraepidermaler („epidermolytischer“) Schädigung der Haut. EBS wird nochmals in einen suprabasalen und basalen Subtyp unterteilt. Die zweite Form von EB heißt Epidermolysis bullosa junctionalis (JEB) mit Gewebsschädigung entlang der Lamina lucida, mit den Subtypen JEB-H (Herlitz) und weiteren JEB (verursacht durch Defekte in unterschiedlichen Zielproteinen). Die dritte Form ist EB dystrophica (DEB) mit Gewebsschädigung in der Lamina densa („dermolytisch“)(*Fine et al., 2008*). Mit Plectin-Mutationen stehen nur Erscheinungsformen des Typs EBS im Zusammenhang, die folgendermaßen unterteilt werden können:

1. EBS mit muskulärer Dystrophie (EBS-MD). Zu Beginn zeigt sich bei betroffenen Patienten nur die für EBS typische Blasenbildung, aber mit dem Einsetzen des zweiten Lebensjahrzehnts kommt es zur Ausprägung der Muskeldystrophie und die Patienten versterben häufig im dritten Lebensjahrzehnt aufgrund der geschwächten Interkostalmuskeln (*Pfendner et al., 2005; Reznicek et al., 2010*).
2. EBS-Ogna. Im Gegensatz zu den oben genannten beiden Formen tritt EBS Ogna nicht autosomal rezessiv, sondern dominant auf. Hier kommt es zu einer „missense-Mutation“ im Exon 31, welches für die Rod-Domäne von Plectin codiert. Im Falle von EBS-Ogna entwickeln sich keine Muskelanomalien und auch das Vorkommen von Pylorus-Atresie wurde im Zusammenhang mit EBS-Ogna noch nicht beschrieben (*Pfendner et al., 2005; Koss-Harnes et al., 2002*).
3. EBS mit Pylorus-Atresie (EBS-PA). Hierbei zeigt sich schwerwiegende neonatale Blasenbildung, kombiniert mit Atresien des Pylorus und Duodenums, die in weiterer Folge häufig zum postnatalen Tod der Patienten führen (*Pfendner et al., 2005; Pfendner et al., 2004*).

Die Haut-, und Muskelphänotypen von Plectin-Null-, bzw. Epidermis-, und Skelettmuskel-spezifischen, konditionellen knock-out Mäusen spiegeln eindrucksvoll die Symptomatik humaner Plectin Erkrankungen wider (*Andrä et al., 1997; Ackerl et al., 2007; Konieczny et al., 2008*).

1.2. Melanocyten, Melanosomen und Transport

Melanocyten sind spezialisierte Hautzellen, die Melanin synthetisieren und exportieren können und somit anderen Zellen Schutz vor ultravioletter Strahlung verleihen. Sie sind für die Pigmentierung von Haut und Haaren verantwortlich und bestimmen somit die Farbe dieser Gewebestrukturen. Man unterscheidet zwei Haupttypen von Melanin: Pheomelanin (gelb/rot) und Eumelanin (braun/schwarz). Melanin wird in eigens dafür vorgesehenen Vesikel (Melanosomen) von Melanocyten zu Keratinocyten exportiert, wo sie ihre Schutzfunktion gegen UV-Strahlung ausüben. Der intrazelluläre Transport in den

Melanocyten erfolgt unter Mithilfe von Myosin Va, welches aktiv am Transport der Melanosomen entlang von Actinfilamenten verantwortlich ist (Mercer et al., 1991, Wu et al., 1998).

In Säugetieren werden Melanosomen in Melanocyten in der Haut, der Hirnhaut, im Auge und dem Ohr gebildet (Barral et al., 2004). Melanocyten sitzen in den basalen Schichten der Haut und der Haarfollikel, wo sie dank ihrer stark verästelten Zellform mit einer Vielzahl von benachbarten Keratinocyten in Kontakt stehen. Wie oben beschrieben werden Melanosomen in den Melanocyten synthetisiert und in die Keratinocyten exportiert, wo sie ihre Funktion als Schutz gegen UV-Strahlung ausüben. Melanosomen sind spezialisierte Organellen, die der Synthese und dem Transport von Melanin dienen. Das Hauptaugenmerk soll hier auf die epidermalen Melanocyten gerichtet werden, da sie Gegenstand dieser Diplomarbeit sind.

Melanosomen waren unter den ersten Lysosom-ähnlichen Organellen, die morphologisch und ultrastrukturell charakterisiert wurden. In der Entstehung unterscheidet man pheomelanogene von eumelanogenen Melanosomen anhand des Auftretens der entsprechenden Pigmente (Pheomelanin: Rote, braune und gelbe Pigmente; Eumelanin: Schwarze, braune Pigmente). In der Reifung der Melanosomen unterscheidet man vier verschiedene Zustände (I-IV), die optisch unterscheidbar sind (Raposo et al., 2007, Wasmeier et al., 2008).

I: Die Prämelanosomen sind unter dem Elektronenmikroskop durchscheinend und entsprechen verglichen mit dem konventionellen endolytischen Syntheseweg frühen Endosomen.

II: In dieser Phase zeigen sich bereits die ersten für Melanosomen typischen Charakteristika. Im Lumen sind parallel angeordnete Fasern zu erkennen, die sich durch das Lumen der Organellen erstrecken. An diesen Fasern erfolgt die Anlagerung und Synthese des Melanins. Im endolytischen Syntheseweg entspricht dieses Stadium späten Endosomen.

III: In dieser Phase treten die Fasern stärker durch vermehrte Ablagerung von Melanin an den einzelnen Strängen hervor. In diesem Zustand sind die Organellen Prälysosomen gleichzusetzen.

IV Durch fortgesetzte Anreicherung von Melanin verschwinden durch die Anhäufung von Melanin in dieser Phase alle Strukturen im Lumen. In diesem Zustand entsprechen die Melanosomen im endolytischen Syntheseweg Lysosomen.

Um die Melanosomen in die Nachbarzellen zu exportieren, müssen sie an die Zellperipherie gebracht werden. Dieser Transport erfolgt sowohl über Mikrotubuli als auch Actinfilamente. Entlang der Mikrotubuli sind Dynein und Kinesin verantwortlich für den bidirektionalen Transport, während am Actinfilament Aktomyosin-Systeme für den Transport sorgen. Nach einem Modell von Gelfand (Gross et al., J Cell Biolog 2002) führt ein „Wettstreit“ um die Bindung der Melanosomen zwischen den oben erwähnten Motorproteinen zur Verteilung der Melanosomen im Cytosol. Mehrere Studien zeigten, dass das Fehlen von Komponenten des Aktomyosin-Systems zu einer Erhöhung des Mikrotubuli vermittelten Transports führt (Gross et al., J Cell Biolog 2002, Wu X et al., J Cell Biolog 1998).

Der Melanosomen-Transportkomplex

Regulierte sekretorische Exportwege sind in hoch entwickelten multizellulären Organismen ein wichtiges Mittel zur interzellulären Kommunikation. Jeder dieser Exportwege verwendet eigene spezialisierte Vesikel als Speicherorganellen für das „Transportgut“ (Izumi *et al.*, 2003). Als Beispiel soll der Melanintransport mittels Melanosomen in Melanocyten angeführt werden, da dieser für die Arbeit von Bedeutung ist. Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung des Melanosomen-Transportkomplexes. Im Falle von Myosin Va, Rab27a und Melanophilin konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen in den entsprechenden Genen zu Störung der Pigmentierung in den betroffenen Lebewesen führen. Die phänotypische Erscheinung von Myosin Va-, Rab27a- und Melanophilin-Defekten wird unter dem Begriff Griscelli-Syndrom (GS) zusammengefasst. Bei dieser autosomal rezessiven Erkrankung führen Mutationen in den Genen für Myosin Va, Rab27a und Melanophilin dazu, dass die Melanosomen nicht mehr aus den Melanocyten exportiert werden können, da sie nicht mehr an die kortikalen Actinfilamente dirigiert werden (Dessinioti *et al.*, 2009).

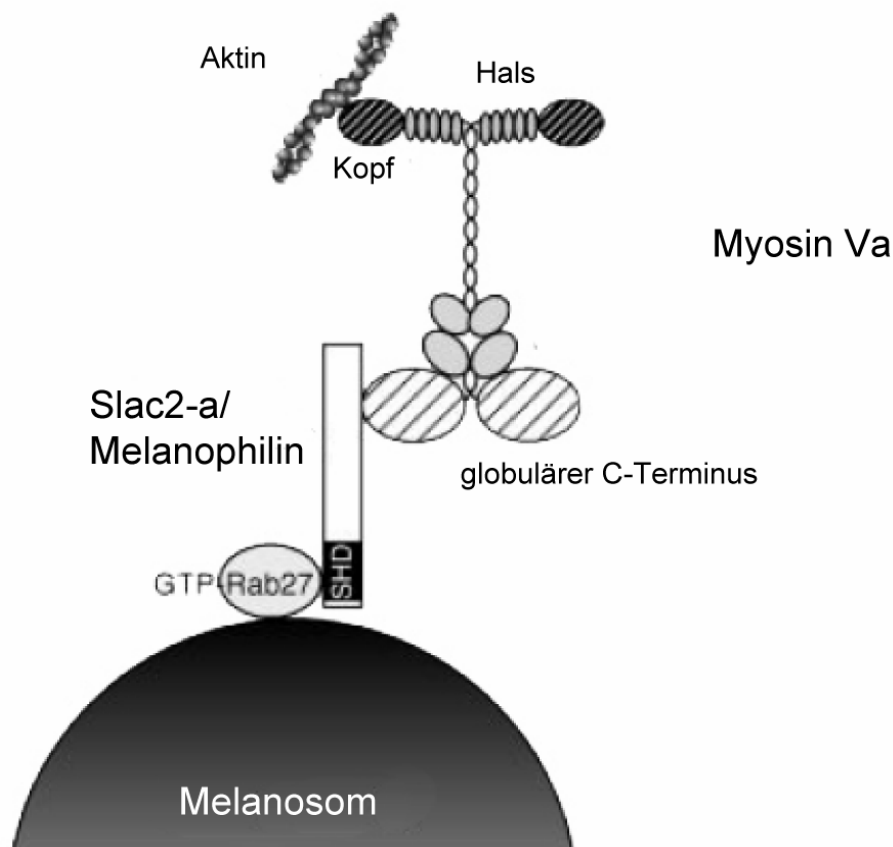


Abbildung 9. Der Melanosomen-Transportkomplex.

Schematische Darstellung des Aufbaus actinassoziierter Melanosomen-Transportkomplexes (Fukada *et al.*, 2002) (leicht verändert).

Myosin

Myosine sind eine große und diverse Familie von Motorproteinen mit der Fähigkeit, unter Hydrolyse von ATP, entlang von Actinfilamenten zu wandern. Zurzeit sind mehr als 18 Myosin-Klassen bekannt (*Foth et al., 2006*), die sich in ihrem Grundbauplan ähneln, aber durch Anpassung an ihre diversen Aufgaben in ihrem Aufbau durchaus variieren. Myosine sind für die Verrichtung vieler verschiedener Tätigkeiten in Zellen zuständig. Die Bandbreite reicht von Muskelkontraktion über intrazellulären Transport bis hin zur Zellfortbewegung. Myosine setzen sich generell aus drei Domänen zusammen: Eine konservierte Kopfdomäne, die für die Actinbindung, die ATPase-Aktivität und die Erzeugung von Bewegung verantwortlich ist; eine kurze Halsdomäne, die normalerweise mit den leichten Myosinketten interagiert und eine variable Schwanzdomäne, die allgemein für die Bindung des „Transportgutes“ zuständig ist (*Foth et al., 2006*).

Da für die folgende Arbeit nur Myosin Va von Interesse ist, soll ein Überblick über Aufbau und Funktionsweise dieses Proteins gegeben werden. Im Fall von Myosin Va bilden zwei „schwere Ketten“ das Grundgerüst des fertigen Proteins. Die Kopfdomänen der schweren Ketten, die der ATP-Hydrolyse und der Interaktion mit Actin dienen, formen globuläre Strukturen aus (*Langford, 2002*). Diese globulären Domänen münden in Hals-Domänen an denen, je nach Myosin-Unterklasse, verschiedene leichte Ketten sitzen. Die leichten Ketten sind verwandt mit Calmodulin und anderen Calmodulin-ähnlichen Proteinen (*Espreafico et al., 1992, Espindola et al., 2000*) und dienen der Regulation sowie der Stabilisierung der Myosinmolekülstruktur. Im Falle von Myosin Va sind es 6 leichte Ketten pro schwere Kette (*Cheney et al., 1993*). Anschließend an die Hals-Domänen findet man einen α -helicalen coiled-coil Stab, an dessen Ende die C-terminalen, globulären Interaktionsdomänen sitzen. Diese Domänen dienen Myosin Va, die zu transportierende Ladung zu erkennen und während der Beförderung durch die Zelle festzuhalten (*Schott et al, 1999*).

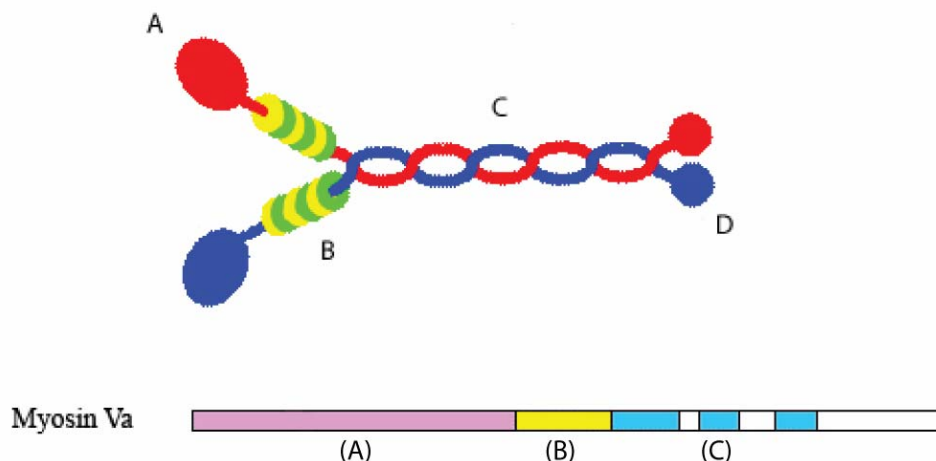


Abbildung 10. Myosin Va: Struktur und Domänenmodell.

(A) Kopfdomänen der zwei schweren Ketten mit Motorfunktion und der Fähigkeit zur ATP-Spaltung zur Energiegewinnung für die Fortbewegung. (B) Leichte-Ketten-Bindungsdomäne mit gebundenen Calmodulin-Molekülen im Fall von Myosin Va. (C) Die coiled-coil Domäne dient der Dimerisierung. (D) Interaktionsdomäne, die es den verschiedenen Myosinen erlaubt, gezielt an die entsprechenden Interaktionspartner zu binden.

Wie die meisten anderen Myosine (mit Ausnahme von Myosin VI) wandert Myosin Va in Richtung der Plusenden der Actinfilamente. Myosin Va kann in verschiedenen Zellen unterschiedliche Vesikel durch Bindung an die C-terminalen globulären Domänen transportieren. Als Beispiele hierfür seien synaptische Vesikel und Melanosomen erwähnt.

Die Fortbewegung von Myosin Va entlang von Actinfilamenten ist prozessiv. Im Gegensatz zu dem nicht-prozessiven Muskel-Myosin II assembliert Myosin V nicht in Oligomere, sondern befördert seine Ladung in monomerer Form (*Metha et al., 2001*). Myosin V muss sich Dank der prozessiven Fortbewegung nicht wie andere Myosin-Typen in regelmäßigen Abständen vom Filament lösen, um an einer neuen Stelle wieder zu binden und so eine Bewegung in eine Richtung zu generieren.

Die „Schrittlänge“ von Myosin Va liegt bei 36nm, was zugleich auch die größte bei Myosinen gemessene Distanz darstellt (*Mehta et al., 1999; Rief et al., 2000; Veigel et al., 2002*). Da die Schrittlänge ungefähr gleich lang ist wie eine Windung im Actinfilament, kommt es beim Myosin V Transport entlang von Actin zu keiner Rotation um das Filament (*Langford, 2002*).

Rab27

Das humane Rab27a-Gen liegt auf Chromosom 15 an der Position 15q15 – q21,1 (*Tolmachova et al., 1999*). Die Rab27 Subfamilie monomerer GTPasen spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Exocytose zellspezifischer Speicherorganellen (*Izumi et al., 2003*). Rab27 GTPasen wirken mittels organellenspezifischer Effektorproteine, wie zum Beispiel Melanophilin in Melanocyten. Dieser Rab27 Effektor-Komplex interagiert dann in weiterer Folge mit Proteinen, die essentiell für den Membrantransport sind, wie zum Beispiel Myosin Va in Melanocyten (*Izumi et al., 2003*). Mittels Rettungsexperimenten in Rab27-defizienten Melanocyten konnte gezeigt werden, dass ektopische Rab27a-Expression den mutanten Phänotyp wieder aufheben kann (*Izumi et al., 2003*). In allen Rettungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass durch Expression von Rab27a Melanosomen wieder in die Dendritenspitzen transportiert werden, wo sie auch mit Rab27a colokalisieren (*Izumi et al., 2003*).

Melanophilin

Das humane Melanophilin-(Mlph) Gen liegt auf Chromosom 2 an der Position 2q37,3 (*Dib et al., 1996*). Melanophilin (Mlph) gehört zu der Familie der synaptotagminartigen Proteine (synaptotagmin-like protein / Slp homolog lacking C2 domains Familie) (*Ménasché et al., 2003*). Melanophilin (Mlph) reguliert das Festhalten der Melanosomen im peripheren Actin-Cytoskelett von Melanocyten. Melanophilin ist ein Modulatorprotein mit Bindungsstellen für das Melanosomen-assoziierte Protein Rab27a und Myosin Va (*Nagashima et al., 2002*). Rab27a wird mittels der N-terminalen Rab27a-Bindungsdomäne (R27BD) rekrutiert, Myosin Va mittels einer zentral gelegenen Myosin Va-Bindungsdomäne (MBD) und Actin mittels einer C-terminalen Actin-Bindungsdomäne (ABD). Mittels Melanosomen-transport-assays konnte gezeigt werden, dass für funktionierenden Melanosomentransport die R27BD und die MBD von Mlph vorhanden sein müssen (*Hume et al., 2006*).

1.3. Ziele der Diplomarbeit

Das erste Ziel der Diplomarbeit war es, die subzelluläre Lokalisation von Plectin 1c in Melanocyten zu untersuchen um festzustellen, ob diese Isoform mit Melanosomen assoziiert ist. Eine weitere Aufgabenstellung war, die Interaktion von Tubulin beziehungsweise MT mit dem N-Terminus von Plectin zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk war hierbei auf die Isoform 1c gerichtet, da die Exon 1c-kodierte Aminosäuresequenz Homologie zu anderen Mikrotubuli-bindenden Proteinen (MAPs) besitzt (Lubomir Janda, nicht publizierte Daten; siehe auch Kapitel 3.2).

Um eine mögliche Plectin-Melanosomen Interaktion nachzuweisen, sollten im ersten Teil der Diplomarbeit zwei verschiedene Ansätze parallel eingesetzt werden. Die erste Aufgabe bestand darin, ein für (IFM)-Analyse geeignetes Zellmodell zu finden, in dem die Expression von Plectin 1c und Myosin Va (als Melanosomenmarker) bestätigt werden konnte. Anschließend musste mittels IFM die subzelluläre Lokalisation von Plectin 1c in diesen Zellen analysiert werden. Danach sollte ebenfalls mittels IF-Mikroskopie überprüft werden, ob es in B16F10 und B16F1 Melanomazellen ein überlappendes Verteilungsmuster von Plectin 1c und bestimmten Melanosomen-Proteinen wie z.B. Myosin Va gibt. Parallel dazu musste untersucht werden, ob Plectin 1c in Melanomazellen mit Melanosomen assoziiert ist. Um eine solche Assoziation zu zeigen sollten die B16F10 Zellen mittels subzellulärer Fraktionierung analysiert werden. Bei dieser Methode werden ganze Zellen aufgebrochen und durch verschiedene Zentrifugationsschritte die Membranfragmente und verschiedenen Organellen der Zellen nach ihrer Dichte aufgetrennt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte zur Untersuchung der direkten Interaktion einzelner N-terminaler Plectinfragmente mit MT das Verhalten der Plectin Isoformen 1c-8, 1a-8 und 2-8 in MT Cosedimentationsexperimenten getestet werden. Da es Hinweise auf eine mögliche Interaktion des Plectin N-Terminus mit Protofilamenten gab, mussten die Cosedimentationsexperimente in einem weiteren Schritt nicht nur mit MT sondern auch mit Tubulin Ringen und Depolymerisationsprodukten auspolymerisierter MT durchgeführt werden. Aufgrund früherer Daten gab es Grund zur Annahme, dass die Plectin Isoformen 1c(2 α 3 α)-8 und 2(2 α 3 α)-8 stärker mit Tubulin Cosedimentieren als andere Plectin Isoformen, daher sollten auch diese Isoformen in die Versuche integriert werden. Der letzte Schritt war, zu definieren, ob hauptsächlich die Isoform 1c mit Tubulin interagiert. Zu diesem Zweck sollten alle Konstrukte auf ihre Cosedimentationsfähigkeit mit Tubulin hin überprüft und miteinander verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. *Biochemie-Proteine*

Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden routinemäßig mittels der Methode nach Bradford (*Bradford, 1976*) bestimmt.

Bradford Reagens:

- 0,1 mg Coomassie Brilliant Blau Serva G
- 50ml Methanol
- 100ml H₃PO₄ 65%
- Mit Aqua Dest. auf 1.000ml

Als zusätzliche Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde der BCA Protein Assay Kit (Pierce) verwendet. (Gemäß der mitgelieferten Gebrauchsanweisung).

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

PAGE Puffer:

- 25mM Tris/HCl
- 250 mM Glycin
- 0.1% SDS
- pH 8,3 bei Bedarf wurde mit Glycin nachgestellt

Probenpuffer (5x):

- 310 mM Tris/HCl pH 6,8
- 25% beta-Mercaptoethanol
- 15% SDS
- 50% Glycerol
- 0,2% Bromphenolblau

Acrylamid M-BIS:

- 30% Stock Solution 29/L (Gerbu)

Trenngelpuffer: 1,5M Tris/HCl

pH 8,8

Sammelgelpuffer: 1M Tris/HCl

pH 6,8

Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit 5x Probenpuffer versetzt, für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und bis zur Auftrennung auf -20°C gelagert. Zur Trennung der Proteine wurden sowohl Mini-Protean II Systeme (BioRad) wie auch Mini-Protean III (BioRad) verwendet. Angepasst an die aufzutrennenden Proteine in den jeweiligen Experimenten wurden Gele bestimmter Acrylamid Konzentrationen gewählt, um eine optimale Auftrennung zu gewährleisten. Nach dem Zusammenbauen der Gelapparaturen wurden zuerst die Trenngele gegossen und zum auspolymerisieren unter Luftabschluss mit

Wasser überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ungefähr 30 Minuten wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel über das bereits polymerisierte Trenngel geschichtet. Je nach Probenzahl und Volumen wurden unterschiedlich große Kämme in das Sammelgel geschoben, um die Geltaschen zu formen. Vor dem Beladen der Gele wurden noch die einzelnen Geltaschen mit Laufpuffer gespült, dann wurde die gesamte Apparatur fertig zusammengestellt und mit Puffer befüllt. Zusätzlich zu den Proben wurde jedes Gel mit einem Protein Marker (zumeist HMW, Gibco) versehen, um nach der Auftrennung eine Leiter mit Proteinen bekannter Molekülmasse / Molekulargewicht als Vergleich zu haben. Zum Laden wurde vorzugsweise eine 50µl Hamilton-Pipette verwendet, die zwischen dem Beladen mit verschiedenen Proben mit Ladepuffer gespült wurde. Zur Trennung wurden die Gele bei 20-25 Milliampere pro Gel laufen gelassen, bis die Bromphenolblau-Front das Trenngel verlassen hatte, oder auch länger, wenn besonders große Proteine aufgetrennt werden sollten.

Trenngele:

Acrylamid Konzentration	H ₂ O	30% Acrylamid-Mix	Trenngelpuffer	10% SDS	10% APS	TEMED	Volumen
6%	2,6	1	1,3	0,05	0,05	0,004	ml
8%	2,3	1,3	1,3	0,05	0,05	0,003	ml
10%	1,9	1,7	1,3	0,05	0,05	0,002	ml

Sammelgele:

Acrylamid Konzentration	H ₂ O	30% Acrylamid-Mix	Sammelgelpuffer	10% SDS	10% APS	TEMED	Volumen
4%	1,83	0,39	0,75	0,03	0,03	0,003	ml

Abbildung 11 Zusammensetzung der PA-Gele

Um für jedes Protein abhängig von seiner Größe die optimale gelelektrophoretische Auftrennung zu bekommen man durch den Anteil an Acrylamid den Vernetzungsgrad der Gele variieren und damit die Durchlaufgeschwindigkeit der Proteine durch das Gel manipulieren

Coomassiefärbung und Trocknen von PA-Gelen

Coomassie Färbelösung:

45% Methanol
10% Essigsäure
45% H₂O
2g Coomassie Brilliant Blau R-250 (pro 500ml)

Entfärbelösung:

10% Essigsäure
30% Methanol
60% H₂O

Die PA-Gele wurden nach der Elektrophorese aus den Apparaturen gelöst, kurz mit dH₂O gespült, und ungefähr 30 Minuten in der Färbelösung bei Raumtemperatur geschwenkt. Im Anschluss wurde für circa eine Stunde bei selben Bedingungen entfärbt, wobei die Entfärbelösung je nach Bedarf gewechselt wurde. Vor dem Trocknen wurde gründlich mit Wasser gespült und das Gel auf ein Stück Whatman Papier transferiert. Im Anschluss wurde das Gel auf einem Gel-Trockner eine Stunde bei 70 °C getrocknet.

Western Blot Analyse

Blot Puffer:

48 mM Tris Base
40 mM Glycin

Ponceau S Färbelösung:

0,5g Ponceau S
1% Essigsäure
99% H₂O

Blockierlösung:

5% Magermilchpulver
0,05% Tween 20
In 1x PBS Lösung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in den PA-Gelen wurden diese 10 Minuten im Blot-Puffer zeitgleich mit der Nitrocellulosemembran (Protran, Schleicher & Schuell) äquilibriert. Danach wurde das Blotsandwich, wie in Abbildung 12 gezeigt, zusammengesetzt. Abhängig von verfügbarer Zeit und Proteingröße wurde die Blotspannung gewählt. Routinemäßig liefen die Blots für Plectin bei 30 V und 4°C über Nacht. Das verwendete Blot-System war ein Mini-Protean II (BioRad).

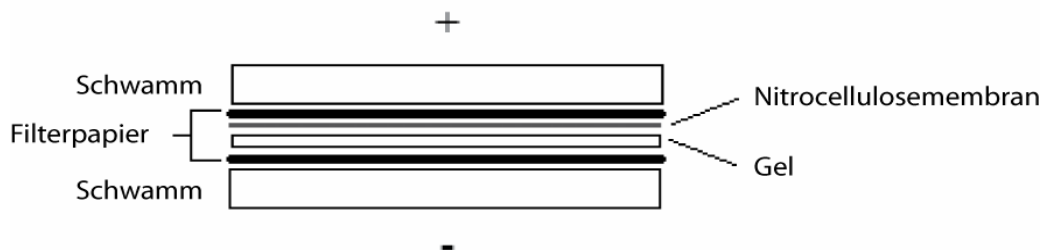


Abbildung 12 Zusammenbau des Blotsandwiches.

Es ist die Wanderungsrichtung der SDS-komplexierten Proteine zur Anode hin zu berücksichtigen. Daher wurde die Nitrocellulosemembran zwischen Gel und Anode positioniert.

Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen und die Proteinbanden des Größenmarkers einzuzichnen, wurde jede Membran nach dem Blot mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Dazu wurde das Blotsandwich auseinandergebaut und die Nitrocellulosemembran für fünf Minuten in der Ponceau S-Lösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Membran mit dH₂O gespült, bis die überschüssige Farbe abgewaschen worden war und nur noch dort, wo Proteine auf der Membran saßen, Farbstoff zu sehen war.

Antikörper Reaktion:

Nach der Ponceaufärbung wurde die Membran mit 1xPBS vom Rest des Farbstoffes gereinigt und für eine Stunde mit der Blockierlösung bei Raumtemperatur blockiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS, um die nicht membrangebundenen Milchproteine zu beseitigen, wurden die Membranen für eine Stunde mit primärer Antikörperverdünnung [Entsprechende Verdünnung des primären Antikörpers in 1x PBS + 0,05% (VIV) Tween 20 + 0,02% NaN₃] bei Raumtemperatur geschüttelt. Alternativ wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die primären Antikörperlösungen wurden zur Wiederverwendung aufgehoben und die Membran fünf mal fünf Minuten mit PBS-T [PBS + 0,05% (VIV) Tween 20] gewaschen. Im Anschluss daran wurde mit der sekundären Antikörperlösung (Sekundäre Antikörper waren entweder HRPO-, oder AP konjugiert und in PBS-T verdünnt) eine Stunde bei leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde erneut fünf mal fünf Minuten mit PBS-T gewaschen und der Blot abhängig vom sekundären Antikörper folgendermaßen entwickelt:

- **HRPO-Blots:** Bei Verwendung von HRPO-konjugierten, sekundären Antikörpern wurde zur Visualisierung das Super Signal West Pico System (Pierce) verwendet. Hierbei wurde die Luminol-Enhancer Lösung 1:1 mit der Peroxidase Lösung gemischt und fünf Minuten mit der Membran inkubiert. Nach Ablauf der fünf Minuten wurde kurz mit ddH₂O gespült und in einer Exponierkassette die Signale auf einem Fuji Röntgenfilm in Form von Zeitreihen dargestellt.
- **AP-Blots:** Zum entwickeln der Blots mit AP Antikörpern wurden 33 µl einer Lösung von 50 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) in 100% Dimethylformamid (DMF) mit 66 µl einer Lösung von 50 mg/ml Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in 70% DMF vermischt und auf 10ml mit AP-Puffer verdünnt. Die Membran wurde dann unter Schütteln so lange in dieser Lösung inkubiert, bis die Signale optimal zu erkennen waren.

AP-Puffer:

100mM Tris-HCl pH 9,5
100mM NaCl
5mM MgCl₂ (wurde frisch bei Verwendung zugegeben)

Antigen	Name/Klon	Referenz / Quelle	Wirt	Verdünnung
Anti-Plektin Serum	#46	Wiche und Baker, 1982	Kaninchen	1/3000
Anti-Plektin Serum	#9	Andrä et al., 2003	Kaninchen	1/2500
Anti-Plektin	#61 E1c	Andrä et al., 2003	Kaninchen	1/1000
Anti-Myosin Va	LE-16	Sigma	Kaninchen	1/250
Anti-Myosin Va Serum (7p23)		zur Verfügung gestellt von Vic Small	Kaninchen	1/500
Anti-Myosin Va Serum (7p24)		zur Verfügung gestellt von Vic Small	Kaninchen	1/500
Anti-α-Tubulin	Klon B-5-1-2	Sigma	Maus	1/1500

Abbildung 13 Primäre Antikörper Western-Blot.

Primäre Antikörper Verdünnungen für den Western-Blot

Antikörper	Referenz / Quelle	Wirt	Konjugat	Verdünnung
Anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch	Ziege	AP	1/5000
Anti-Maus	Jackson ImmunoResearch	Ziege	AP	1/5000
Anti-Kaninchen	Bio-Rad	Ziege	HRPO	1/20000
Anti-Maus	Bio-Rad	Ziege	HRPO	1/10000

Abbildung 14 Sekundäre Antikörper Western-Blot.

Verdünnungen der sekundären Antikörper im Western-Blot unterschieden nach Konjugat, Zielorganismus und Wirt

Quantitative Bestimmung von Proteinbanden

Röntgenfilme und Gele wurden in einem ScanJet 8250 C Scanner (HP) mit einer Auflösung von 300 dpi gescannt. Nachbearbeitung der digitalisierten Bilder erfolgte mittels Photoshop Software (Adobe). Die so erhaltenen Proteinbanden wurden mit der Quantiscan Software (BioSoft) quantifiziert.

Strippen von Nitrozellulosemembranen

Stripping-Puffer:

200 mM NaCl

200 mM Glycin pH 2,5

Die entwickelten Western Blots wurden von den primären und sekundären Antikörpern befreit, indem sie drei mal 30 Minuten bei Raumtemperatur unter schütteln mit Stripping Puffer inkubiert wurden. Zum Abschluss wurden die Membranen fünf Minuten mit ddH₂O gespült.

Herstellung von Zelllysaten

Lyse-Puffer:

1% SDS

10% Glyzerin

10 mM Tris/HCl pH 7,5

80-90% konfluente Zellen in einer 10 Ø cm Schale wurden einmal mit 1 x PBS gespült und 300 µl heißen Lyse-Puffers wurden auf die Zellen pipettiert. Die Reste der lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber in die 300 µl Puffer abgekratzt und die DNA wurde durch mehrmaliges aufziehen (10 x) durch eine 27 G-Nadel geschert. Das so entstandene Lysat wurde in ein Eppendorf Röhrchen transferiert und für fünf Minuten bei 95°C auf einem Thermomixer erhitzt. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

Aufreinigung von Tubulin aus Schweinegehirn

Die Aufreinigung erfolgte nach der von Weingarten 1975 beschriebenen Methode. Da bei dieser Proteinaufreinigung darauf zu achten war, dass der gesamte Ablauf möglichst reibungslos vonstatten geht, um eine höchstmögliche Ausbeute an intaktem Tubulin zu erhalten, waren bereits bei Beginn der eigentlichen Arbeit alle Geräte temperiert. Der Großteil der Arbeiten wurde bei 4°C durchgeführt, um ein Polymerisieren des Tubulins zu verhindern, es sei denn es war erwünscht. Für die folgenden Arbeitsschritte und Versuche wurde stets PEM-Puffer verwendet und bei 4°C gearbeitet, außer es ist anders erwähnt.

Transport Puffer:

0,32 M Saccharose

1 mM EGTA

Plus 30 mg PIPES und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

Extraktions Puffer:

0,52 M Saccharose

1 mM EGTA

Plus 30 mg PIPES und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

10x PEM Puffer:

1 M PIPES

10 mM EGTA

10 mM MgCl₂

Bei 1:10 Verdünnung sank der pH Wert auf ca. 6,8

100 mM ATP Stock-Solution

100 mM GTP Stock-Solution

Die umgehend nach der Schlachtung der Schweine entfernten Gehirne (ca. 1kg; 6-8 Stück) wurden umgehend in einen Plastiksack mit einem Liter Transport Puffer gegeben, und auf Eis in das Labor transportiert. Um nun das Gewicht der tatsächlich eingesetzten Hirnmasse zu bestimmen, wurde ein 1.000 ml Becherglas gefüllt mit 100 ml eiskaltem Extraktionspuffer abgewogen (=W1). Die Gehirne wurden von Bindegewebe, Gefäßen und Blut so gut es ging befreit und die Graue Masse (Cortex) mit einer Schere von der darunter liegenden, weißen Masse getrennt. Im Anschluss daran wurde die graue Masse in dem Gefäß mit den 100 ml Extraktionspuffer nochmals gewogen (=W2). Daraus errechnete sich die eingesetzte Hirnmasse (=W3): $W3 = W2 - W1$. Darauf hin wurde die Gehirnmasse W3 1:1 mit Extraktionspuffer versetzt (entsprach 1ml Puffer / g Hirngewebe) und 1 mM ATP sowie 0,1 mM GTP zugegeben. Die Gehirnmasse im Extraktions Puffer wurde drei mal zehn Sekunden in einem Küchenmixer zerteilt und anschließend in einem Glas-Teflon Homogenisator durch 4-6 Züge homogenisiert. Von diesem Homogenat wurde das Volumen (=S0) bestimmt und zur späteren Analyse ein Aliquot von 25 µl genommen. Der Rest wurde bei 4°C eine Stunde lang bei 75.000 x g zentrifugiert. Danach wurden 25 µl Proben vom Pellet (=P1) und vom Überstand genommen und das Volumen des Überstands (=S1) bestimmt. S1 wurde nun mit $\frac{1}{10}$ 10 x PEM Puffer verdünnt und Glycerin auf eine Endkonzentration von 3,5 M zugegeben. Nach der Zugabe von 0,1 mM GTP wurde S1 in Zentrifugenröhren 45 Minuten auf 37°C in einem Wasserbad inkubiert, um das Tubulin zu polymerisieren. Nach Ablauf der 45 Minuten wurde S1 bei 75.000 x g in der vorgewärmten

Zentrifuge und dem vorgewärmten Rotor bei 37°C für 90 Minuten zentrifugiert. Von dem daraus resultierenden Pellet (=P2) und dem Überstand (=S2) wurden wieder die 25 µl Aliquots genommen und das Pellet, welches jetzt den Großteil des Tubulins in polymerisierter Form enthielt, wurde bei 4°C in ein Becherglas überführt und mit ¼ des Volumens S1 1x PEM-Puffer und 1 mM GTP in einem Glashomogenisator resuspendiert (45 Min mit drei sanften Zügen alle 15 Minuten). Das so in PEM-Puffer resuspendierte Tubulin wurde eine Stunde lang bei 4° C und 75.000 x g zentrifugiert. Von dem so gewonnenen Überstand (=S3) und Pellet (=P3) wurden wieder 25 µl Aliquote genommen und S3 wurde auf 3,5 M Glyzerin gebracht und mit GTP (0,0035 x vol S3 von einer 100 mM GTP Stock Solution) versetzt und auf Zentrifugenbecher aufgeteilt. Danach wurde S3 erneut (bereits in den Zentrifugenbechern) für 45 Minuten bei 37° C im Wasserbad geschüttelt um das Tubulin zu polymerisieren. Nach Ablauf der 45 Minuten wurde S3 einem weiteren Zentrifugelauf bei 37°C für eine Stunde mit 75.000 x g unterzogen. Die so gewonnenen Pellets (=P4) sowie der Überstand (=S4), wurden erneut für die spätere Analyse aliquotiert, und die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die schockgefrorenen Pellets wurden bei -80° C gelagert.

Vor dem letzten Reinigungsschritt musste eine Phosphozellulose-Säule vorbereitet werden, um das Tubulin von den MAPs zu trennen. 30 g Whatmann P-11 Phosphozellulose wurden in zwei Litern 50% Ethanol gelöst und 30 Minuten vorsichtig gerührt. Im Anschluss daran wurde drei mal fünf Minuten mit ddH₂O gewaschen und die Phosphozellulose in zwei Litern 0,5 M NaCl Lösung gelöst und 30 Minuten gerührt. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde der Waschschrift wie oben beschrieben wiederholt und die Phosphozellulose (PC) in zwei Litern 0,5 M HCl 30 Minuten gerührt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und nach dem erneuten Waschen mit ddH₂O wurde die Phosphozellulose in 2 Litern PEM-Puffer resuspendiert und 20 Minuten gerührt. Der Überstand dieser Lösung wurde mit NaOH auf pH 6,1 eingestellt und weitere drei Stunden sanft gerührt. Nach diesen drei Stunden wies der Puffer pH 6,4 auf, woraufhin der PEM-Puffer (2 L) noch einmal gewechselt, und über Nacht gerührt wurde. Am nächsten Tag (ca. 10 Stunden später) war der pH-Wert zwischen 6,3 und 6,4.

Wenn Bedarf an Tubulin bestand, wurde eines der Pellets aufgetaut, einem weiteren Polymerisations- Depolymerisationszyklus unterzogen und in kleinen Mengen aliquotiert auf -80°C gelagert. Die wie oben beschrieben gewonnenen Pellets (P4) wurden in 2 ml 1 x PEM-Puffer resuspendiert und bei 4° C eine Stunde lang in einem Glashomogenisator alle 15 Minuten drei mal sanft homogenisiert. Diese Tubulinlösung wurde 30 Minuten bei 4° C und 75.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 1 mM GTP gebracht und 45 Minuten im 37° C Wasserbad polymerisiert. Nach erneuter Zentrifugation von 30 Minuten bei 37° C und 75.000 x g wurde das Pellet in 2 ml 1x PEM Puffer und 1mM GTP 30 Minuten auf Eis in einen Glashomogenisator (3 Züge alle 15 Minuten) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt 30 Minuten, bei 4° C und 75.000 x g wurde der so gewonnene Überstand auf eine wie oben beschrieben vorbereitete Phosphozellulose Säule geladen, um das Tubulin von den MAPs zu trennen. Während das Tubulin durch die Säule gelaufen und als erste nachweisbare Proteinfraction wieder ausgetreten ist, sind die MAPs in der Säule festgehalten und mit 1 x PEM und 0,8 M NaCl eluiert worden.

MT-Cosedimentation

Verwendete Plectinfragmente

Kurzbezeichnung des Proteinfragments	Plasmidname	Exon Zusammensetzung
P1c-8	pJK17	1c 2 Δ 3 Δ 4 5 6 7 8
P1a-8	pJK1	1a 2 Δ 3 Δ 4 5 6 7 8
P2-8	pGR74	2 Δ 3 Δ 4 5 6 7 8
P1c-8(2α3α)	pJK2	1c 2 2α 3 3α 4 5 6 7 8
P1a-8(2α3α)	pJK5	1a 2 2α 3 3α 4 5 6 7 8
P2-8(2α3α)	pGR70	2 2α 3 3α 4 5 6 7 8

Abbildung 15 Übersicht über die in den Cosedimentationsexperimenten verwendeten Plectin Fragmente

Die Tabelle zeigt die Kurzbezeichnung, den Plasmidnamen und die Exonzusammensetzung der verwendeten Plectin ABD. Die grau hinterlegten Exons kommen in der angeführten Reihenfolge in den Plectinkonstrukten vor (Deltas füllen Positionen von Exons die in der jeweiligen Isoform nicht vorkommen).

Ablauf

Mikrotubuli:

Reines PC (Phosphozellulose) Tubulin wurde auf Eis aufgetaut und 10 Minuten bei 45.000 x g (4°C) in einer Beckmann Ultrazentrifuge (TLA-45 Rotor) präzentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss mit 1 mM GTP und 10 % Glycerin (v/v) für eine Stunde bei 37°C polymerisiert. Nach der Polymerisation wurde die Proteinkonzentration mittels der Methode nach Bradford bestimmt.

Tubulin Ringe:

Ringpuffer:

80mM PIPES

1mM EGTA

40mM MnSO₄

1mM MgCl₂

Bei den Versuchen wurde 2 mM GDP frisch zugegeben

Puffer für Plectin-Konstrukte:

80mM PIPES

1mM EGTA

40mM MnSO₄

1mM MgCl₂

1mM DTT

0;1% Triton X-100

Für die Protofilament-Studien wurde Tubulin zu Ringen polymerisiert. Dazu wurden die Tubulinaliquots und auch die in der Cosedimentation eingesetzten Plectinkonstrukte umgepuffert. Der Pufferaustausch erfolgte in Microspin-Säulen (Bio-Rad) mittels Gefiltrations-Chromatographie. Dazu wurden die Säulen mit 4 x 500 µl Puffer äquilibriert, zentrifugiert (2 min, 4° C, 2.300 rpm) und schließlich wurden die Proteine durch Zentrifugation umgepuffert

(4 min, 4° C, 2.300 rpm). Die Konstrukte wurden anschließend 10 min bei 4° C und 45.000 rpm vorzentrifugiert. Das GDP Tubulin wurde anschließend bei 37° C 30 min polymerisiert.

Um die durch Polymerisation gebildeten Tubulin-Strukturen zu untersuchen, wurde jeweils an diesem Punkt eine Probe für die Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie genommen.

Nach der Polymerisation wurde die Proteinkonzentration mittels der Methode nach Bradford bestimmt. Daraufhin wurden die Mikrotubuli mit den entsprechenden Plectinkonstrukten für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionsansätze bei 45.000 x g erneut für 15 min (37° C) zentrifugiert und die Überstände mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, während die Pellets in der entsprechenden Menge PEM-Puffer resuspendiert wurden. Bevor die Pellets ebenfalls mit 5 x SDS-Probenpuffer behandelt wurden, wurde noch eine Probe für Negativ-Färbungen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung genommen. Im Anschluss daran wurden die mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzten Überstände und Pellets für fünf Minuten bei 95°C erhitzt und bis zur Elektrophorese auf -20°C gelagert.

Elektronenmikroskopie (Negativ-Färbung)

Vorbereitung der 400 Mesh Kupfer Raster (Formvar-Überzug)

Die frisch hergestellte 0,4 % Formvar-Lösung wurde über Nacht sanft gerührt. Zur Herstellung des Formvar-Films wurde zunächst ein Objektträger mit dem Finger befettet und zweimal für ungefähr drei Sekunden in die Formvar-Lösung getaucht. Nach zirka zwei bis drei Minuten Trockenzeit wurde der an dem Objektträger haftende Formvar-Film mit einer Rasierklinge entlang der Ränder geschnitten und durch vorsichtiges Eintauchen in ein ddH₂O gefülltes Gefäß zum Aufschwimmen gebracht. Die Kupfer Raster wurden nun mit der Oberseite nach unten mit einer Pinzette vorsichtig auf den schwimmenden Film gelegt. Im nächsten Schritt wurde der beladene, schwimmende Film mit einem neuen Objektträger aus dem Wasser gefischt, wobei darauf zu achten war, dass die Kupferraster mit der glänzenden Seite (Oberseite) nach oben auf dem Objektträger zu liegen kamen. Zum Schluss wurden die mit Formvar überzogenen Kupfer Raster über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Kohlenstoff-Bedampfung

Die Formvar-Überzogenen Kupfer Raster mussten vor Verwendung noch mit Kohlenstoff bedampft werden. Dazu wurden sie in einer Edwards-Kammer nach Anleitung des Herstellers behandelt.

Probenpräparation

Je nach Proteinkonzentration wurden zirka 5-8 µl der Probe auf ein wie oben beschrieben vorbereitetes Kupfer-Raster aufgetragen und für eine Minute inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Probe mit 2% Uranyl-Acetat in ddH₂O gewaschen und gefärbt. Dazu wurde das Uranyl-Acetat für 40 Sekunden langsam über das Raster getropft. Nach

Ablauf dieser 40 Sekunden wurde das Raster zum Trocknen in einer Box gelagert und später unter dem Elektronenmikroskop untersucht.

Immunofluoreszenz Mikroskopie

Zur Aufnahme aller Bilder wurde ein Konfokales Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskop (LSM) 510 (Zeiss) verwendet. Die Bilder wurden mit Adobe Photoshop und Illustrator Software nachbearbeitet.

Methanolfixierung der Zellen:

Zellen wurden für Immunofluoreszenz Aufnahmen in Kulturschalen bis zu ca. 70% Konfluenz wachsen gelassen, zwei mal mit 1 x PBS gewaschen und 90 Sekunden lang mit auf -20° C gekühltem Methanol auf einem Strata-Cooler behandelt. Danach wurde das Methanol so schnell wie möglich entfernt und dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Solcher Art fixierte Zellen wurden in PBS bis zu einer Woche bei 4° C aufgehoben.

Blockieren der unspezifischen Antikörper Bindungsstellen

Blockierlösung:

2% BSA

0,02% NaN₃ in 1 x PBS

Die Kulturschalen wurden zirka 0,5 bis 1 cm hoch mit der Blockierlösung gefüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt.

Primäre Antikörper Reaktion

Die Antikörper Verdünnungen wurden mit Blockierlösung und der entsprechenden Konzentration des primären Antikörpers (siehe Abb. 17) hergestellt. Die bereits blockierten Kulturschalen wurden mit einem Fettstift in vier gleichgroße Bereiche geteilt und in jede dieser so entstandenen Zonen wurden zirka 150 µl der Antikörper Verdünnungen aufgetropft und eine Stunde lang inkubiert.

Waschen

Die Kulturschalen wurden nach Ablauf der Stunde drei mal zehn Minuten unter Schütteln mit 1x PBS gewaschen.

Sekundäre Antikörper Reaktion

Die sekundären Antikörper wurden in entsprechender Konzentration (siehe Abb. 18) mit 1 x PBS verdünnt und zirka 150 µl von den Verdünnungen wurden für eine Stunde auf die entsprechenden Bereiche aufgebracht. Nach Ablauf der Stunde wurde der Waschschritt wie oben beschrieben wiederholt und die markierten Bereiche für die Untersuchung unter dem Mikroskop eingebettet.

Einbettung

Moviol Lösung:

6 g Glyzerin

2,4 g Moviol wurden in

6 ml ddH₂O gelöst und zwei Stunden gerührt

12 ml 0,2 M Tris/HCl pH 5,8 beigegeben und zehn Minuten gerührt

Auf 50° C erhitzt und 15 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert.

Der so gewonnene Überstand wurde bei -20° C gelagert und für die Fixierung verwendet.

Die Kulturschalen wurden nach dem letzten Waschschrift zweimal mit ddH₂O gespült um im weiteren Verlauf die Bildung von unerwünschten Salzkristallen aus PBS-Resten zu vermeiden. Nach vorsichtiger Entfernung des Wassers wurden die einzelnen Bereiche mit 8 µl der Moviol Lösung bedeckt und die Deckgläser vorsichtig darüber gelegt, um Luftblasenbildung zu vermeiden. Die so präparierten Proben wurden zum Aushärten 24 Stunden im Dunklen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die folgenden Tabellen zeigen die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen bei den Immunofluoreszenz Aufnahmen und des Weiteren die Wirte in denen die Antikörper gewonnen wurden.

Antigen	Name/Klon	Referenz / Quelle	Wirt	Verdünnung
Anti-Plektin	10F6	Foisner et al., 1991	Maus	1/1
Anti-Plektin Serum	#46	Wiche und Baker, 1982	Kaninchen	1/400
Anti-Plektin	E1a	Reznicek et al. 1998	Kaninchen	1/800
Anti-Plektin	#61 E1c	Andrä et al. 2003	Kaninchen	1/200
Anti-Actin	(AC-40)	Sigma	Maus	1/100
Anti-Myosin Va Serum	(7p23)	zur Verfügung gestellt von Vic Small	Kaninchen	1/50
Anti- α -Tubulin	(Klon B-5-1-2)	Sigma	Maus	1/1000

Abbildung 16 Primäre Antikörper IF-Mikroskopie.

Die bei Immunfluoreszenzaufnahmen verwendeten Verdünnungen der primären Antikörper, sortiert nach Zielprotein und den dazugehörigen Wirten.

Antikörper	Referenz / Quelle	Wirt	Konjugat	Verdünnung
Anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch	Ziege	TR	1/200
Anti-Maus	Jackson ImmunoResearch	Ziege	TR	1/200
Anti-Kaninchen	Molecular Probes	Ziege	A-488	1/800
Anti-Maus	Molecular Probes	Ziege	A-488	1/800
Anti-Ratte	Jackson ImmunoResearch	Ziege	Cy2	1/150
Anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch	Esel	TR	1/200
Anti-Ziege	Jackson ImmunoResearch	Esel	Cy2	1/1000
Anti-Maus	Jackson ImmunoResearch	Esel	Cy5	1/800
Anti-Ratte	Jackson ImmunoResearch	Ziege	TR	1/200

Abbildung 17 Sekundäre Antikörper IF-Mikroskopie.

Die Verdünnung der bei Immunfluoreszenzaufnahmen verwendeten sekundären Antikörper
Nach Wirt, Ziel und Konjugat sortiert.

2.2. Zellkultur

Verwendete Zelllinien

B16F1	Maus Melanomazellen
B16F10	Maus Melanomazellen

Fidler konnte bereits 1973 zeigen, dass es sich bei B16F10 Maus Melanomazellen um eine pigmentierte Melanoma Zelllinie handelt (*Fidler, 1973*). Weiters konnte gezeigt werden, dass diese Zelllinie Melanosomen produziert und den von uns gewählten Melanosomenmarker Myosin Va exprimiert (*Nascimento et al., 1997*).

Auftauen von Zellen

Zellen wurden in einem 37° C Wasserbad aufgetaut und rasch in ein 15 ml Greiner-röhrchen, gefüllt mit 10 ml des entsprechenden Wachstumsmediums, überführt. Nach zwei Waschschritten (einmal mit PBS und einmal mit Wachstumsmedium) wurden die Zellen in Kulturschalen ausgesät.

Kultivierung der Zelllinien

Starkes Trypsin/EDTA:

0,25 % Trypsin

2 % EDTA

Steril filtriert und bei -20°C gelagert

Schwaches Trypsin/EDTA:

0,05 % Trypsin

0,2 % EDTA

Steril filtriert und bei -20°C gelagert

B16F1 und B16F10 Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glucose, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden bei 80-90 % Konfluenz in einem Verhältnis von 1:4 im Falle von B16F1 und 1:10 im Falle von B16F10 geteilt und das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Um die Zellen von den Schalen abzulösen, wurde das Medium abgesaugt und die Schale mit 1 x PBS gespült. Abhängig von der Größe der Kulturschale wurde im Fall von B16 Zellen starkes

Trypsin/EDTA (3ml für 10 cm Schale, 1 ml für 6 cm Schale) für ungefähr drei Minuten auf die Zellen gebracht und nach Ablauf der Zeit wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde von der Platte in ein Greiner-Röhrchen überführt und die Zellen für drei Minuten bei 1.000 u/min pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden nach Entfernung des alten Trypsin/Mediumgemischs in frischem Wachstums-

medium resuspendiert und entsprechend der Teilungsrate auf neuen Platten im Verhältnis 1:4 (B16F1) oder 1:10 (B16F10) ausgesät.

Um eine entsprechende Menge an Zellen für eine Kultivierung in einer Rollflasche zu haben, mussten die Zellen einer konfluenten 10 cm Kulturschale in die Rollflasche überführt, mit 200 ml Wachstumsmedium versehen und für ungefähr zehn Sekunden mit CO₂ begast werden, um eine entsprechende CO₂-Atmosphäre für die Zellen zu schaffen. Nach zwei Tagen Inkubation bei 1/3 Umdrehungen pro Minute und 37° C wurde das Medium gewechselt und die Zellen zwei weitere Tage inkubiert. Die so erhaltenen Zellen wurden für subzelluläre Fraktionierungen verwendet.

Differenzierung von B16F10 Zellen

Pro-Melanogene Bedingungen:

Zur Induktion der Melaninproduktion in B16F10 Zellen wurden dem Kulturmedium 0,4 μ M Melanocyten-stimulierendes-Hormon (α -MSH, Sigma) und 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX, Sigma) zugeführt (Nascimento et al. 1997). Nach Inkubation für 48 Stunden unter den Standardkulturbedingungen wurden die Zellen fixiert.

Pro-Migratorische Bedingungen:

Um die Zellmigration und damit verbunden die Lamellipodienbildung in den B16F10 Zellen anzuregen, wurden diese auf mit Laminin1 (LN1, Sigma) überzogenen Kulturschalen ausgesät und mit Phorbol 12-myristat 13-acetat, (PMA, Calbiochem) 100 ng/ml Finalkonzentration behandelt (Ballestrem *et al.*, 2000). 60 Minuten nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert.

Subzelluläre Fraktionierung von Melanomazellen

Für die Subzelluläre Fraktionierung wurde die Methode von *Seiji et al., 1963* abgeändert nach *Nascimento et al., 1997* verwendet und ebenfalls leicht modifiziert.

Extraktionspuffer: 40 mM HEPES pH 7.7
10 mM EDTA
5 mM ATP (Frisch bei Gebrauch zugegeben)
1 Protease Inhibitor Tablette / 4 ml Puffer (Frisch bei Gebrauch zugegeben)

Nachdem die Zellen die gewünschte Dichte erreicht hatten, wurden sie auf Eis mit einem Zellschaber abgeerntet, mit einem fünffachen Volumen an Puffer verdünnt und auf Eis in einem Glas-Glas Homogenisator (20 Züge) aufgebrochen. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4° C und auf Eis durchgeführt, um Protease Aktivität gering zu halten. Um die Effizienz des mechanischen Zellaufschlusses zu überprüfen, wurden kleine Mengen des Homogenats unter dem Lichtmikroskop untersucht, um festzustellen wie viele der Zellen tatsächlich aufgebrochen waren. Das Volumen des so gewonnenen Homogenats wurde bestimmt (=X ml) und für zehn Minuten bei 700 x g (4° C) zentrifugiert (P1 und S1). Der so entstandene Überstand (S1) wurde bei 11.000 x g für weitere 10 Minuten (4° C) zentrifugiert, um Pellet P2 und Überstand S2 zu erhalten. Das Pellet (P2) wurde in X ml Extraktionspuffer mit 0,3 M Saccharose resuspendiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 15.000 x g für 10

Minuten (4° C) wurden die LGF (= P3) und der Überstand S3 erhalten. Die LGF (large granular fraction) wurde in 1/6 X ml Extraktionspuffer (mit 0,3 M Saccharose) resuspendiert und auf einen zuvor vorbereiteten Saccharose-Gradienten geladen.

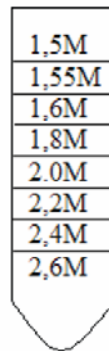


Abbildung 18 Saccharose Gradient für die Subzelluläre Fraktionierung.

Dieser Gradient wurde in einem Sw40Ti Schwingbecher Rotor bei 100.000 x g bei langsamer Beschleunigung und ohne Bremsen zentrifugiert, um den Gradienten nicht zu beschädigen. Die so gewonnenen Zonen wurden nach der Zentrifugation einzeln abgenommen und mit 5 x SDS-Probenpuffer versehen und bei -20°C für die spätere Untersuchung gelagert. Das schwarze Melanosomenpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens wurde in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert und ebenfalls mit 5 x SDS-Probenpuffer aufgeköcht und bei -20°C gelagert.

3. Ergebnisse

Durch die zwei unterschiedlichen Fragestellungen, in die sich diese Diplomarbeit teilt (siehe Kapitel 1.3), gliedert sich auch der Ergebnis und Diskussionsteil in jeweils 2 Kapitel. Teil eins befasst sich mit der Plectin – Melanosomen Interaktion und Teil zwei behandelt die Interaktion des Plectin N-Terminus mit Tubulin/MT.

3.1. *Plectin – Melanosomen Interaktion*

Analyse der Proteinexpression von Plectin 1c und Myosin Va in B16F10 Zellen

Da B16F10 Maus Melanomazellen, wie im Material und Methodenteil beschrieben, Melanosomen produzieren und Myosin Va exprimieren musste noch festgestellt werden, ob sich diese Zellen für unsere Versuche eignen. Dazu wurde zunächst die Plectin 1c-Expression mittels Western-Blotting analysiert.

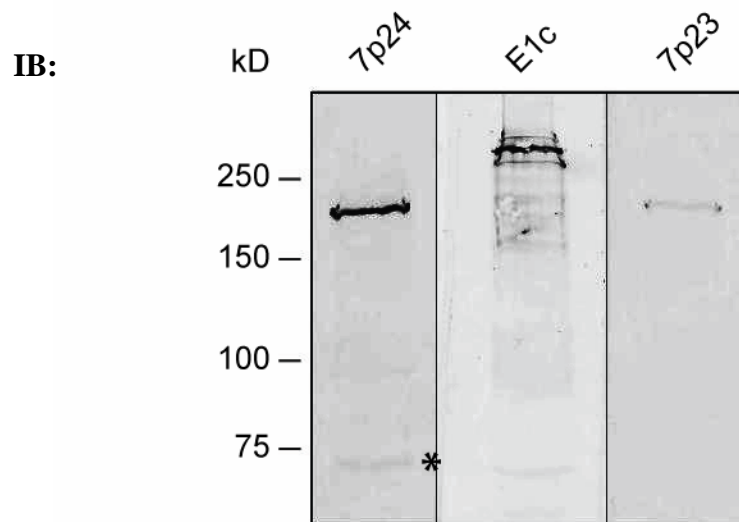


Abbildung 19. Plectin1c und Myosin Va-Expression in B16F10 Zellen.

Western-Blot Analyse von B16F10 Totalzelllysaten mit Antiseren gegen Myosin Va (7p23, 7p24) und Plectin Isoform 1c (E1c) gerichteten Antikörpern. Die Zellen wurden in Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert und im Anschluss mit SDS-Lyselösung (siehe Material und Methoden) lysiert. Sowohl anti-Plectin 1c als auch anti-Myosin Va Antikörper dekorierten Banden der zu erwartenden Größen. Das Signal des anti-Myosin Va-Antiserums 7p24 war zwar stärker als das von 7p23, zeigte aber schwache Kreuzreaktion (Asterisk).

Wie aus Abbildung 19 zu ersehen, wird unter normalen Kulturbedingungen sowohl Plectin 1c als auch Myosin Va in B16F10 Zellen exprimiert. Obwohl das bei Verwendung von anti-Myosin-Antikörpern 7p23 erhaltene Signal schwächer war als das, mit anti-Myosin-Antikörper 7p24 erhaltene, wurde in weiterer Folge immer Antikörper 7p23 verwendet, da dieser keine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen aufwies. Mit Antikörper 7p24 war eine weitere, wenn auch schwache, Bande zu erkennen. Diese unspezifische Reaktion war der Grund, warum Antikörper 7p23 den Vorzug gegenüber dem 7p24 Myosin Va-Antikörper erhielt. Klar zu ersehen ist jedoch, dass beide Antikörperspezies Antikörper die erwartete Myosin Va-Bande bei 190kD erkannten.

Unterschiedliche Expression der Plectin-Isoformen 1c und 1 unter verschiedenen Kulturbedingungen

Nachdem der Beweis erbracht worden war, dass B16F10 Zellen Plectin1c exprimieren, sollte geklärt werden, welche anderen Plectin Isoformen in diesen Zellen zu finden sind und auch, ob die Zellen je nach Kulturbedingungen verschiedene Isoformen unterschiedlich stark exprimieren. Zu diesem Zweck wurden B16F10 Zellen entweder mit IBMX und α -MSH behandelt (pro-melanogene Konditionen) oder auf Laminin 1-beschichteten Zellkulturschalen in Gegenwart von PMA kultiviert (pro-migratorische Bedingungen) und danach die Plectin-Isoformexpression mit der von Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen verglichen. Um diesen Vergleich anstellen zu können, mussten die Gesamtproteinmengen der einzelnen Lysate zunächst aneinander angeglichen werden.

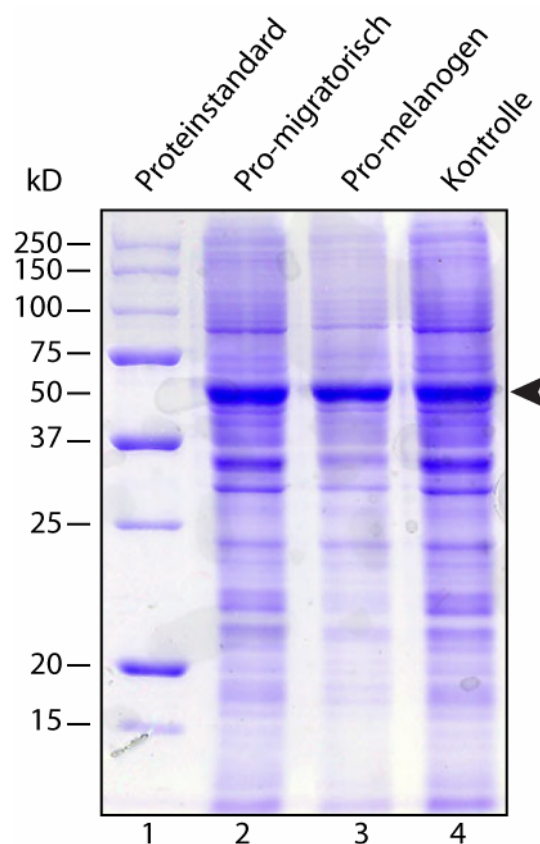


Abbildung 20. Coomassie-Färbung eines 10% SDS-PA-Gels, mit B16F10 Zelllysaten, die unter verschiedenen Kulturbedingungen kultiviert wurden.

Spuren 1, Proteinstandard; 2, Zelllysate pro-migratorisch differenzierter Zellen; 3, Zelllysate pro-melanogen differenzierter Zellen; 4, Zelllysate undifferenzierter Zellen. Pfeilspitze: Referenzprotein das zur Normalisierung herangezogen wurde.

Um die Proteinmengen der einzelnen Lysate anzugleichen, wurde ein PA-Gel mit gleichen Mengen der verschiedenen Zelllysate beladen. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurde der Proteingehalt einer Coomassie-gefärbten Proteinbande densitometrisch ermittelt und zwischen den verschiedenen Lysaten verglichen. Entsprechend der gemessenen Signalstärke eines beliebig gewählten Referenzproteins (hier bei ~50 kD) wurde errechnet, wie viel des jeweiligen Lysats geladen werden musste, um gleiche Gesamt-

mengen an Protein einzusetzen (Abb. 20). Mittels Western-Blot Analyse wurden dann die Expressionsmengen der verschiedenen Plectin Isoformen verglichen.

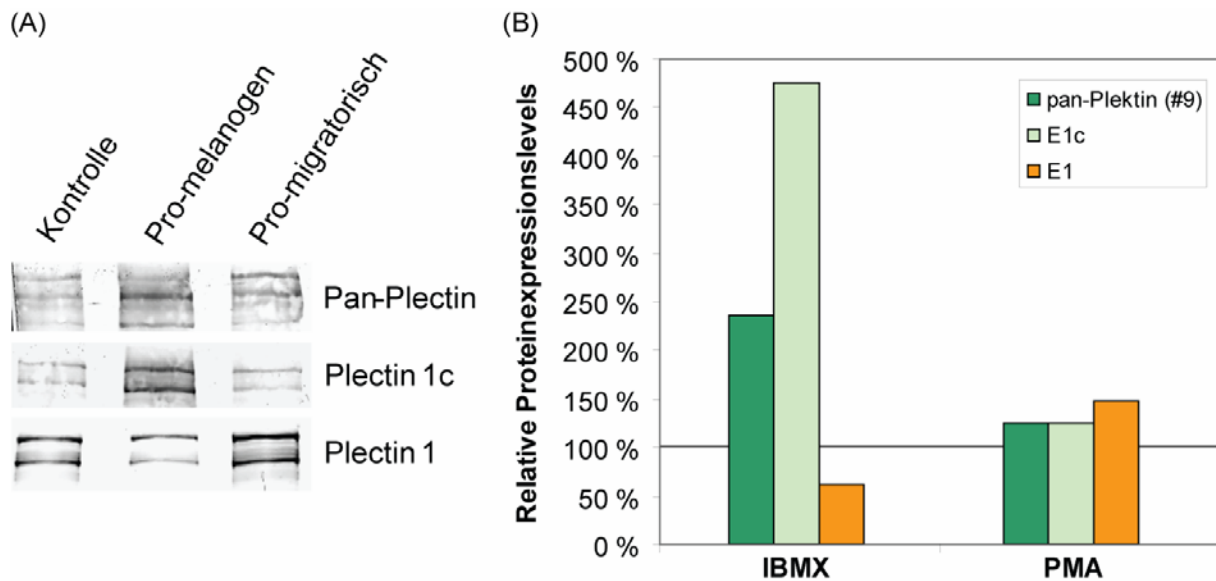


Abbildung 21. Western Blot Analyse der Expression verschiedener Plectin-Isoformen in B16F10 Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden.

Veränderung der Expressionsmengen verschiedener Plectin-Isoformen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen von B16F10 Zellen. (A) Western Blots. (B) Quantifizierung der Western Blots aus (A). Dargestellt wurden die Protein Expressionsmengen relativ zur Expression unter Standardkulturbedingungen (100%). Während unter basalen Wachstumsbedingungen Plectin 1 die am stärksten exprimierte Isoform zu sein scheint, kommt es unter pro-melanogenen Wachstumsbedingungen zu einer Erhöhung der Plectin 1c Expression. (A) Dies ist vermutlich auf eine gesteigerte Plectin 1c Expression zurückzuführen. (B) Unter pro-migratorischen Bedingungen kommt es zu einer Erhöhung des Plectin1 Levels.

Die Western Blot-Analyse zeigte, dass unter normalen Kulturbedingungen die Plectin 1 Isoform stärker exprimiert wurde als unter pro-melanogenen Bedingungen (Abb. 21 A, B). Im Falle der Isoform 1c war es umgekehrt. Unter pro-melanogenen Wachstumsbedingungen war eine generelle Erhöhung der Plectin Expression zu beobachten, die wahrscheinlich auf die erhöhte Plectin 1c Expression zurückzuführen war. Die Expression von Plectin 1 war unter diesen Bedingungen erniedrigt. Betrachtet man die Plectin-Expression unter pro-migratorischen Bedingungen, so stellen wir fest, dass die Expression der Isoform 1 im Vergleich zu normalen Wachstumsbedingungen zunahm (Abb. 21 A, B). Diese Resultate zeigten, dass verschiedene Plectin-Isoformen in B16F10 Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen unterschiedlich stark exprimiert werden. Die Erhöhung der Plectin 1c Expression unter pro-melanogenen Bedingungen könnte man als ersten Hinweis auf eine mögliche Rolle von Plectin im Melanosomentransport interpretieren. Ähnlich war in anderen Studien gezeigt worden, dass die Expression von Komponenten des Melanosomen-Transport-Systems, wie Myosin Va oder Rab27, unter pro-melanogenen Kulturbedingungen hoch-reguliert wird (Passeron *et al.*, 2004).

Zelluläre Verteilung von Plectin 1c in B16F10 Zellen

Basierend auf den Plectin-Isoform-Expressionsdaten sollte untersucht werden, ob die pro-melanogenen Bedingungen zusätzlich zur Erhöhung der Plectin 1c Expression auch zu

einer Umverteilung von Plectin 1c in den B16F10 Zellen führen. Dazu wurden B16F10 Zellen unter den oben erwähnten Kulturbedingungen gezüchtet, fixiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

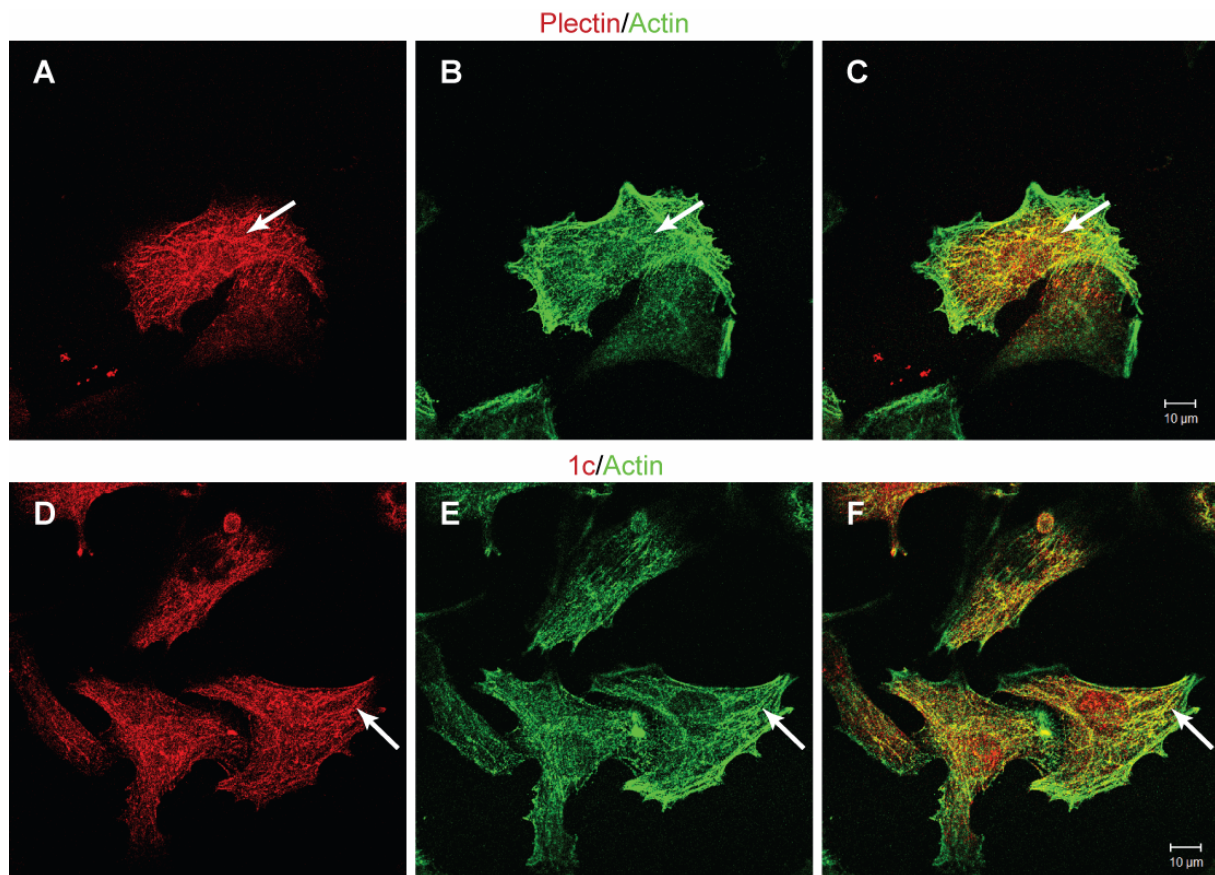


Abbildung 22. IFM unter Normalbedingungen kultivierter B16F10 Zellen (70% konfluent).

Antigene wie angegeben. Zur Detektion von Plectin wurde Antiserum #46 verwendet. Pfeile, Colokalisation von Actin und Plectin.

Immunfärbungen mit einem anti-pan Plectin Antiserum (Serum #46), welches gegen alle Plectin-Isoformen gerichtet ist, zeigten in undifferenzierten B16F10 Zellen ein deutlich filamentöses Verteilungsmuster von Plectin (Abb. 22, A; Pfeil). Ein ähnliches Muster wurde auch für die Plectin-Isoform 1c gefunden (Abb. 22, D; Pfeil). Doppelimmunfärbungen zeigten eine partielle Colokalisation von Plectin und Isoform 1c und Actinfilamenten im Cytoplasma von B16F10 Zellen (Abb. 22, C,F; Pfeile). Doppelimmunfärbungen unter Verwendung von Antikörpern gegen Plectin 1c und α -Tubulin zeigten darüber hinaus auch eine partielle Colokalisation von Plectin und Isoform 1c und Mikrotubuli (Abb. 23, C,F; Pfeile). Bei stärkerer Vergrößerung wurde deutlich, dass Plectin 1c-positive, punktförmige Strukturen in diskontinuierlicher Verteilung entlang von Mikrotubuli aufgereiht waren (Abb. 23, G-I). Ein ähnliches Verteilungsmuster von Plectin 1c war zuvor schon in kultivierten Keratinocyten und neuronalen Zellen beobachtet worden (Andrä *et al.*, 2003) R. Garcia De La Cruz-Valencia und G. Walko, unpublizierte Daten. Darüber hinaus war eine Verteilung von Plectin 1c entlang von Mikrotubuli auch in primären Melanocyten gezeigt worden (R. Garcia De La Cruz-Valencia, unpublizierte Daten). Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie des basalen Bereiches von B16F10 zeigten eine Akkumulation von Plectin 1c in Vinculin-positiven, fokalen Adhäsionskontakten (Zamir *et al.*, 2000; Wu, 2007) (Abb. 24, C,F; Pfeile). Interessanterweise waren aber nicht alle fokalen Adhäsionskontakte plectin-positiv (Abb. 24, F, Pfeilspitzen), aber vor allem jene, die sich unterhalb des Zellzentrums befanden, also eher

älteren, „reifen“ Kontakten entsprachen (Abb. 24, D-F, Pfeile). Im Gegensatz dazu schienen die jüngeren „unreifen“ Adhäsionskontakte an der Zellperipherie meistens Plectin 1c-negativ (Abb. 24, D-F, Pfeilspitzen).

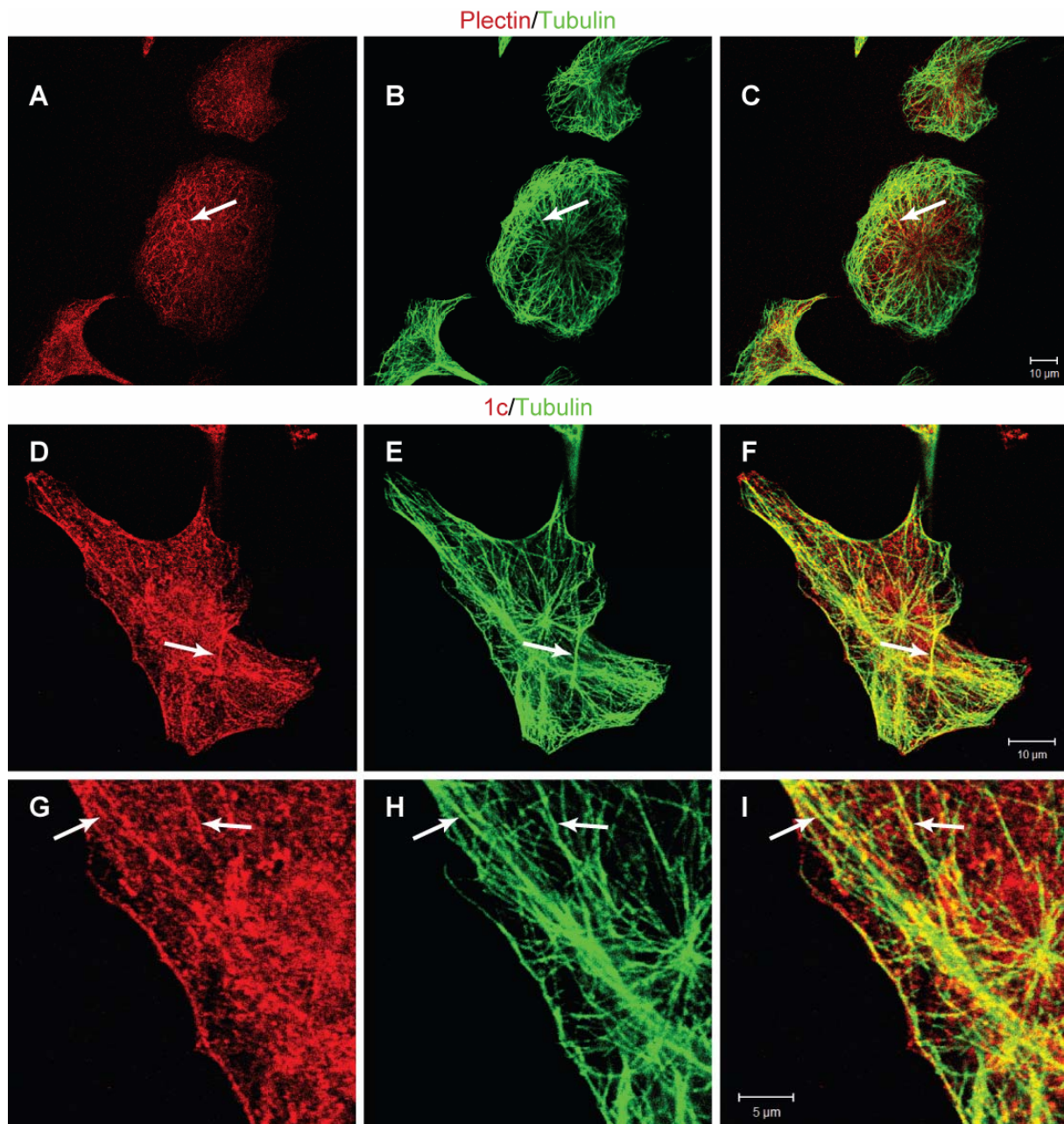


Abbildung 23. IFM unter Normalbedingungen kultivierter B16F10 Zellen (70% konfluent).

Antigene wie angegeben. Zur Detektion von Plectin wurde Antiserum #46 verwendet. Pfeile, Colokalisation von Tubulin und Plectin.

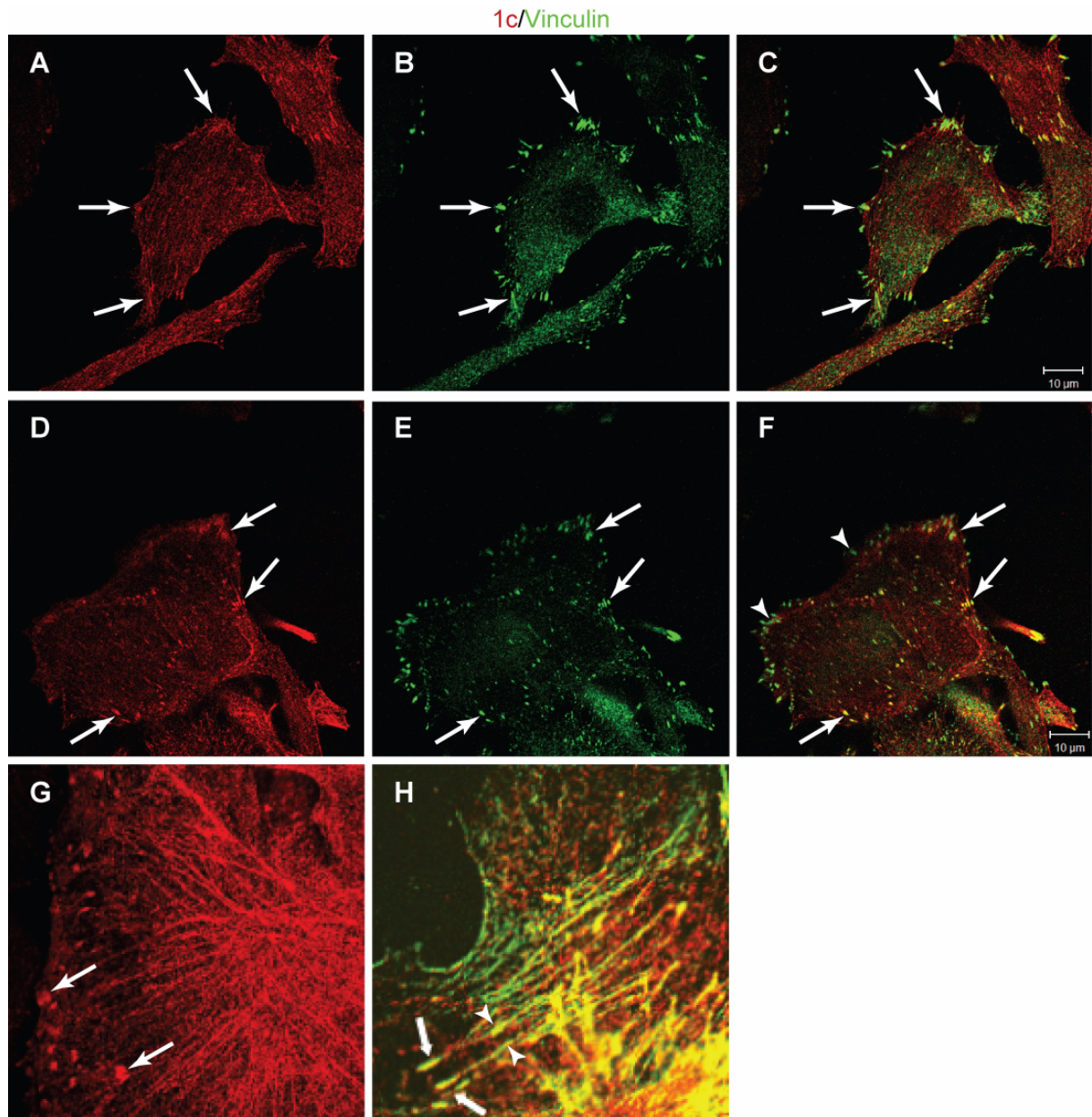


Abbildung 24. IFM unter Normalbedingungen kultivierter B16F10 Zellen (70% konfluent).
 Antigene wie angegeben. (A-F) Pfeile, Colokalisation von Vinculin und Plectin Isoform 1c; Pfeilspitzen, Adhäsionskontakte ohne Plectin. (G,H) Pfeile, Fokale Adhäsionskontakte; Pfeilspitzen, Stressfasern.

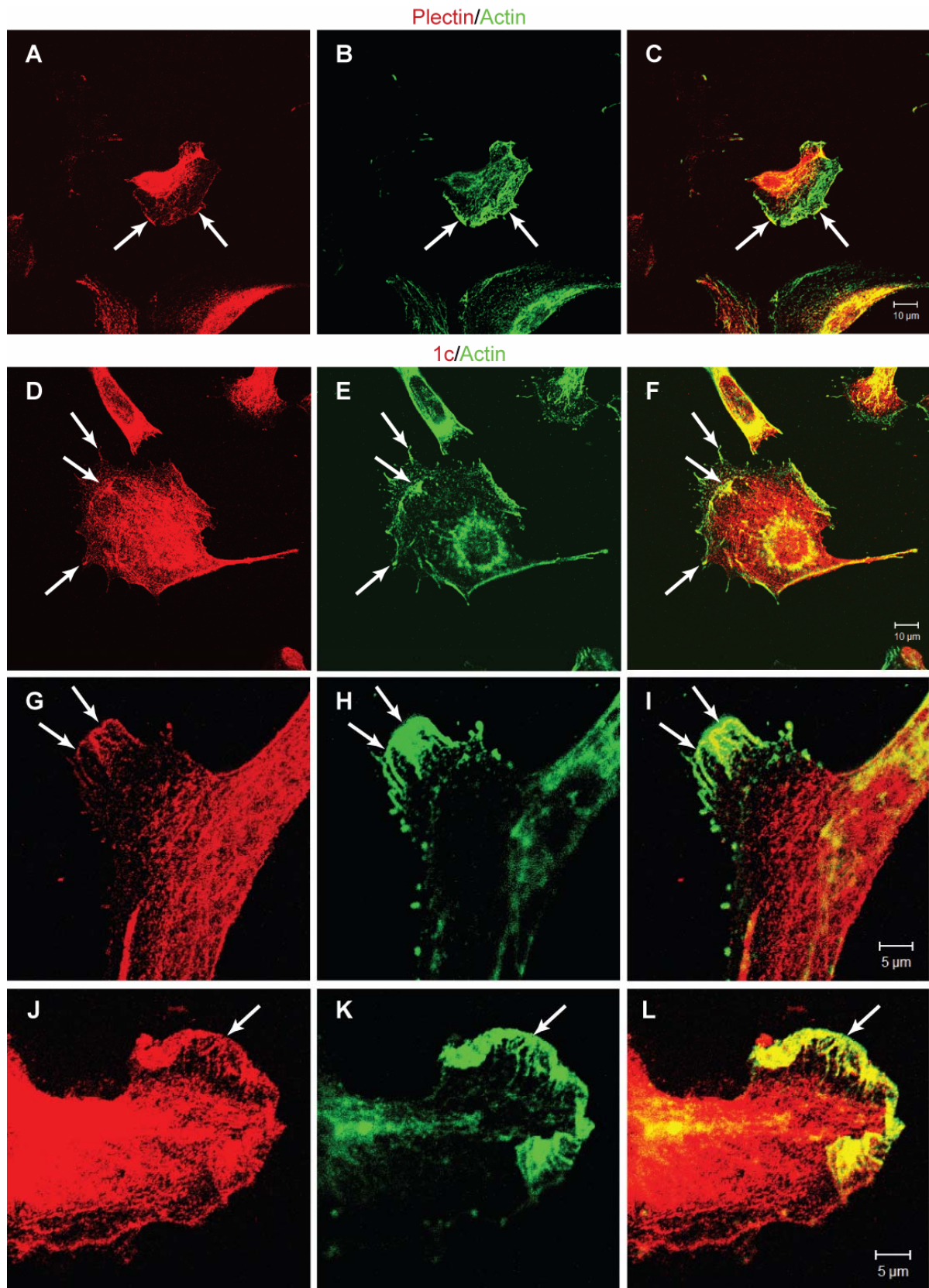


Abbildung 25. IFM unter pro-migratorischen Bedingungen kultivierter B16F10 Zellen (70% konfluent). Antigene wie angegeben. Zur Detektion von Plectin wurde Antiserum #46 verwendet. Pfeile, Colokalisation von Actin und Plectin.

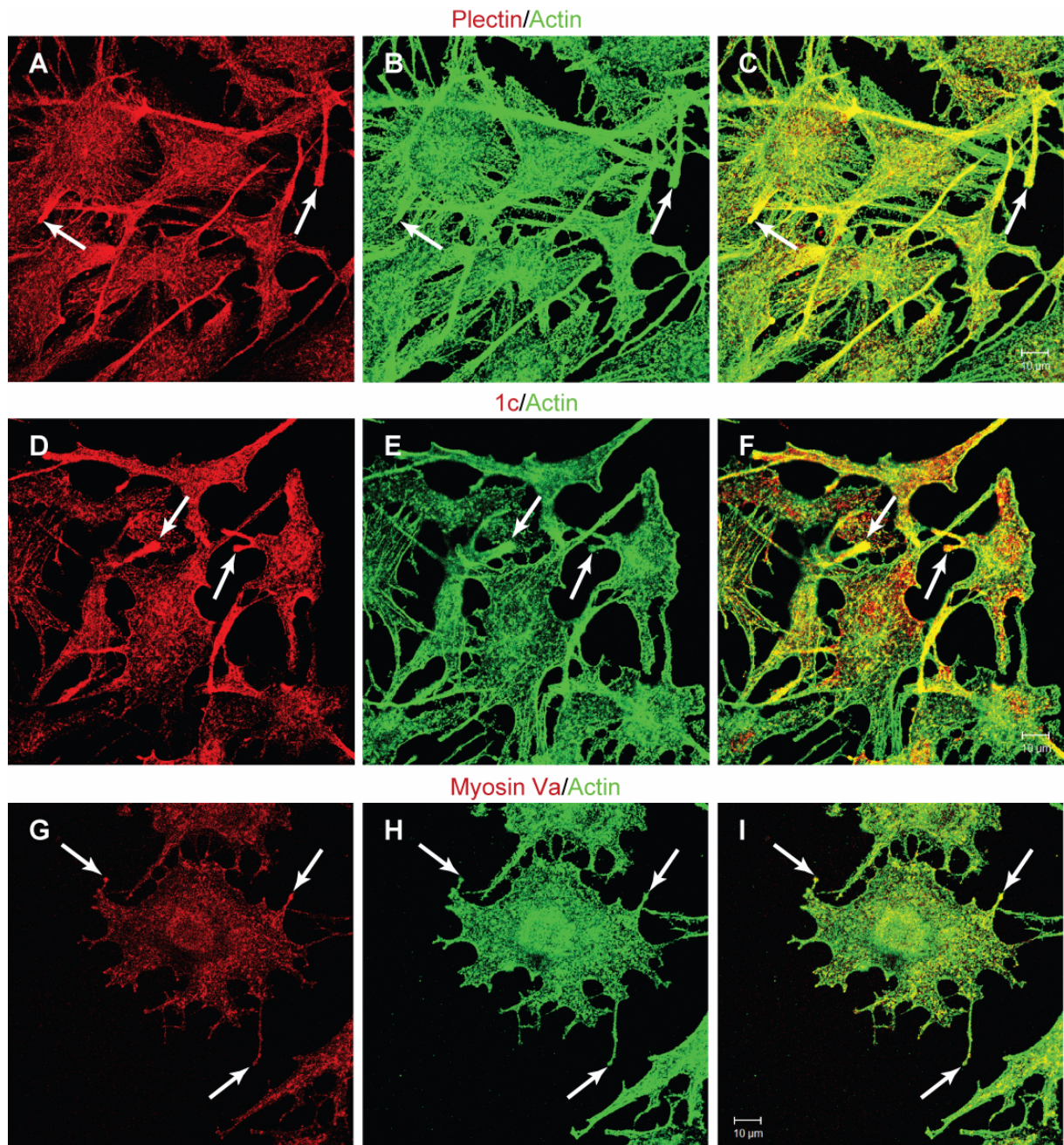


Abbildung 26. IFM unter pro-melanogenen Bedingungen kultivierter B16F10 Zellen (>70% konfluent).
 Antigene wie angegeben. Zur Detektion von Plectin wurde Antiserum #46 verwendet, zur Detektion von Myosin Va Antiserum 7p23. Pfeile, Colokalisation von Actin und Plectin oder Actin und Myosin Va.

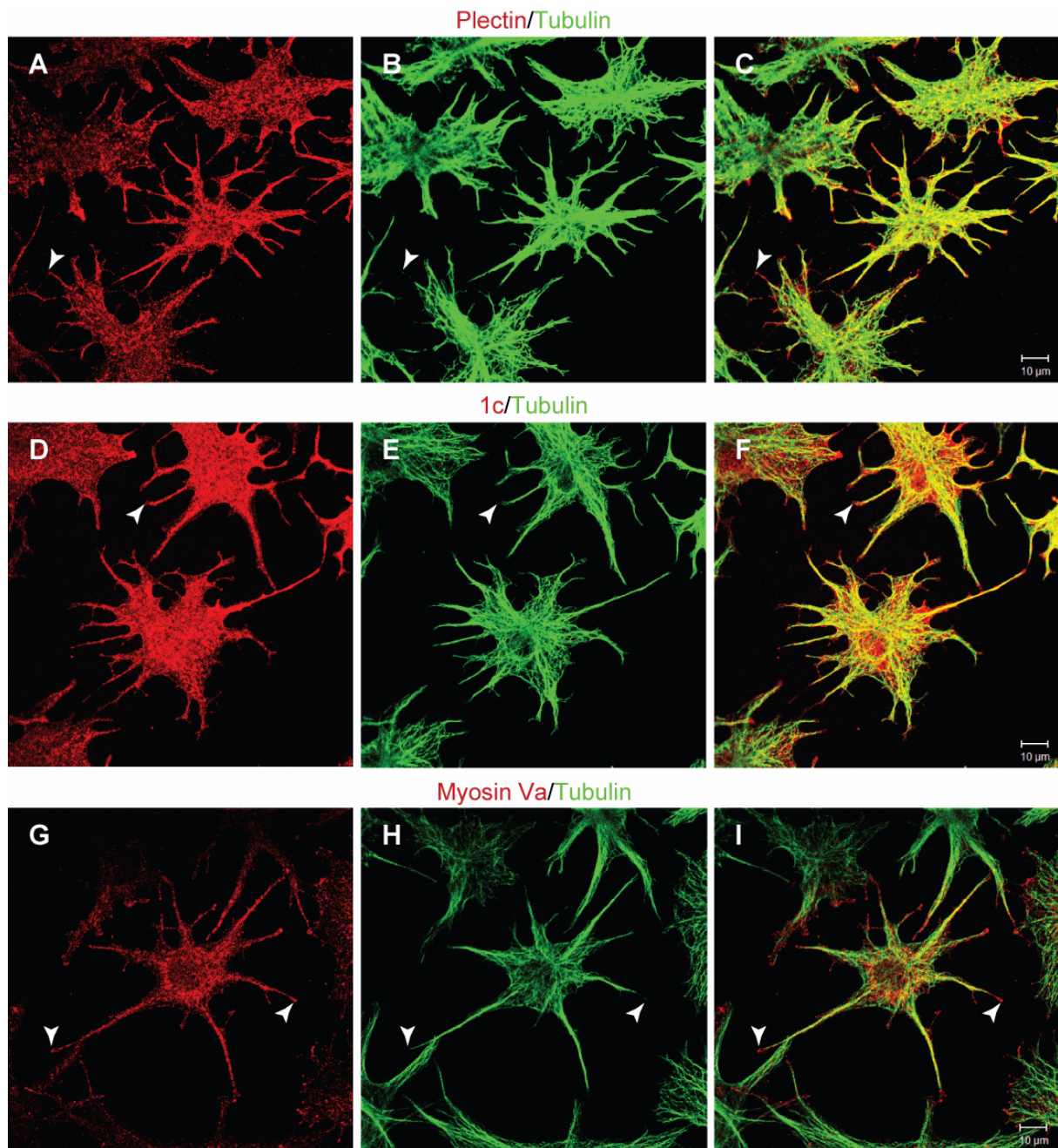


Abbildung 27. IFM unter pro-melanogenen Bedingungen kultivierter B16F10 Zellen (>70% konfluent). Antigene wie angegeben. Zur Detektion von Plectin wurde Antiserum #46 verwendet, zur Detektion von Myosin Va Antiserum 7p23. Pfeilspitzen, Dendritenspitzen in denen Plectin oder Myosin Va zu finden sind, aber kein Tubulin.

Eine Z-Projektion von mehreren optischen Schnitten durch eine B16F10 Zelle zeigte deutlich die Anhäufung von Plectin 1c an der Zellperipherie, während im Cytoplasma ein filamentöses Verteilungsmuster von Plectin 1c dominierte (Abb. 24, G). Doppelimmunfärbungen von Plectin 1c und Actin ergaben, dass Plectin 1c im basalen Bereich der Zelle nicht nur in fokalen Adhäsionskontakten lokalisiert war, sondern auch entlang von Stressfasern, die in fokalen Adhäsionskontakten mündeten (Abb. 24, H).

Unter pro-migratorischen Bedingungen war Plectin (1c) hauptsächlich in Membran-Ruffles und an der Führungskante von Lamellipodien zu finden (Abb. 25, C,F,I,L).

Zusammengefasst wurde sowohl eine partielle Colokalisation von Plectin 1c mit Actinfilamenten und fokalen Adhäsionskontakten, als auch mit Mikrotubuli beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Plectin 1c nicht nur an Actin, sondern auch an Mikrotubuli binden kann.

Kultivierung von B16F10 Zellen unter pro-melanogenen Kulturbedingungen führte zu einer dramatischen Veränderung der Zellmorphologie, bei der die Zellen eine sternförmige Struktur mit dentritenartigen Fortsätzen bekamen (Abb. 26, 27) (*Nascimento et al., 1997*). Actin und Myosin Va akkumulierten beide an den Spitzen dieser Dentriten (Abb. 26, B, E, G-I; Pfeile), wie bereits zuvor beschrieben worden war (*Chakraborty et al., 2003; Nascimento et al., 1997; Bahadoran et al., 2003*). Zur Akkumulation dieser beiden Proteine an den dentritischen Spitzen kommt es durch das Einfangen von Myosin Va-assoziierten Melanosomen am Actin-reichen Cortex der Dentriten (*Wu et al., 1998; Nascimento et al., 1997; rezensiert in Aspengren et al., 2009*). Interessanterweise kam es unter pro-melanogenen Kulturbedingungen auch zu einer Akkumulation von Plectin 1c an den dentritischen Spitzen (Abb. 26, C,F; Pfeile). Im Gegensatz dazu akkumulierten Mikrotubuli unter pro-melanogenen Kulturbedingungen nicht in den dentritischen Spitzen (Abb. 27, B, E, H), was im Einklang mit bereits publizierten Daten früherer Untersuchungen des Melanosomentransports steht (*Wu et al., 1998*).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass Plectin 1c in B16F10 Zellen bevorzugt mit Actin-reichen Strukturen assoziiert ist und dass es unter Kulturbedingungen, die zu einer erhöhten Produktion von Melanin und zu verstärkter Akkumulation von Melanosomen an den Spitzen der dentritenartigen Fortsätze führen, auch zu einer Akkumulation von Plectin 1c in den dentritenartigen Fortsätzen kommt. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Plectin 1c eng mit dem Actin-Cytoskelett der Melanocyten und möglicherweise mit Melanosomen assoziiert ist. Des Weiteren konnte auch eine partielle Colokalisation mit MT dokumentiert werden. Um zu testen, ob Plectin 1c mit Melanosomen assoziiert ist, wurde in weiterer Folge eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt.

Cosedimentation von Plectin 1c mit Melanosomen

Unter pro-melanogenen Kulturbedingungen differenzierte B16F1 Zellen (siehe Kapitel 2.2) wurden mit einem Glas auf Glas Homogenisator aufgebrochen und das daraus resultierende Homogenat mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten zentrifugiert, um zelluläre Vesikel und Organellen entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Für dieses Experiment wurden B16F1 Zellen verwendet, da sie deutlich intensiver pigmentierte Melanosomen besitzen als die zuvor verwendeten B16F10 Zellen. Nach jedem einzelnen Schritt wurden Proben genommen, um diese bei späteren Tests auf das Vorhandensein von Plectin und Myosin Va zu testen. In einem letzten Schritt wurde die großgranuläre Fraktion (LGF),

welche unter anderem auch Melanosomen und die mit Ihnen assoziierten Bestandteile des Melanosomen-Transportkomplexes enthalten sollte, auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen und anschließend ultrazentrifugiert. Die Melanosomen konnten am Ende der Zentrifugation als schwarzes Melanosomen Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens gefunden werden. Alle während des Experiments genommenen Proben wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, und mittels Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein von Plectin, Isoform 1c und Myosin Va (als Marker für das Melanosomen-assoziierte Cytoskelett) in den einzelnen Fraktionen überprüft.

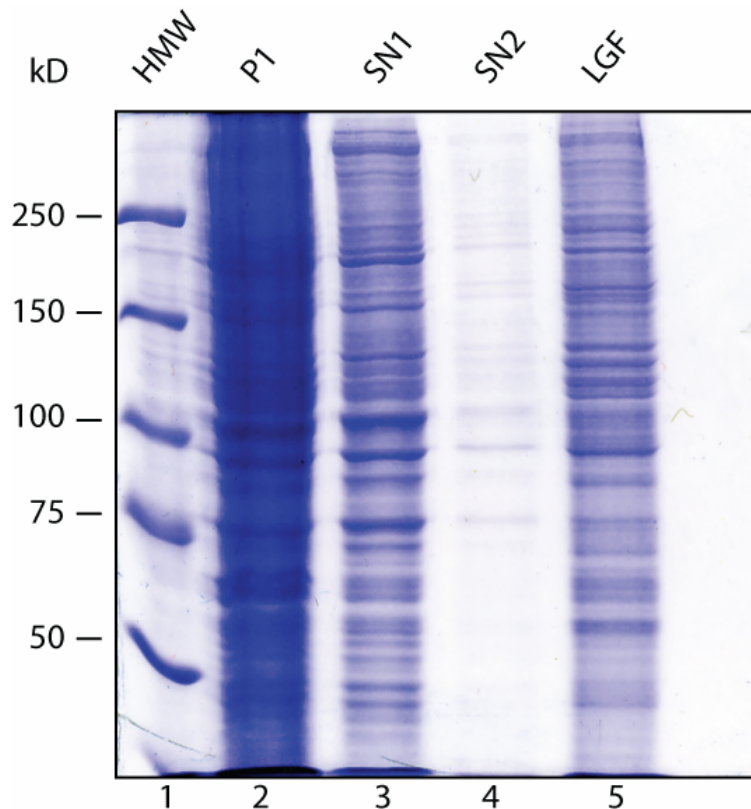


Abbildung 28. Coomassie – gefärbtes 10% SDS PA-Gel beladen mit Proben der subzellulären Fraktionierung.

Spuren 1, Proteinstandard; 2, Pellet der ersten Zentrifugation (P1); 3, dazugehöriger Überstand (SN1); 4, Überstand der zweiten Zentrifugation (SN2); 5, die großgranuläre Fraktion (LGF).

Von besonderem Interesse war das resuspendierte Melanosomen Pellet, da hier, sollte es tatsächlich eine Assoziation von Plectin beziehungsweise der Isoform 1c mit Melanosomen geben, von sowohl Plectin als auch Myosin Va eine Bande bei der entsprechenden Proteingröße zu erwarten war.

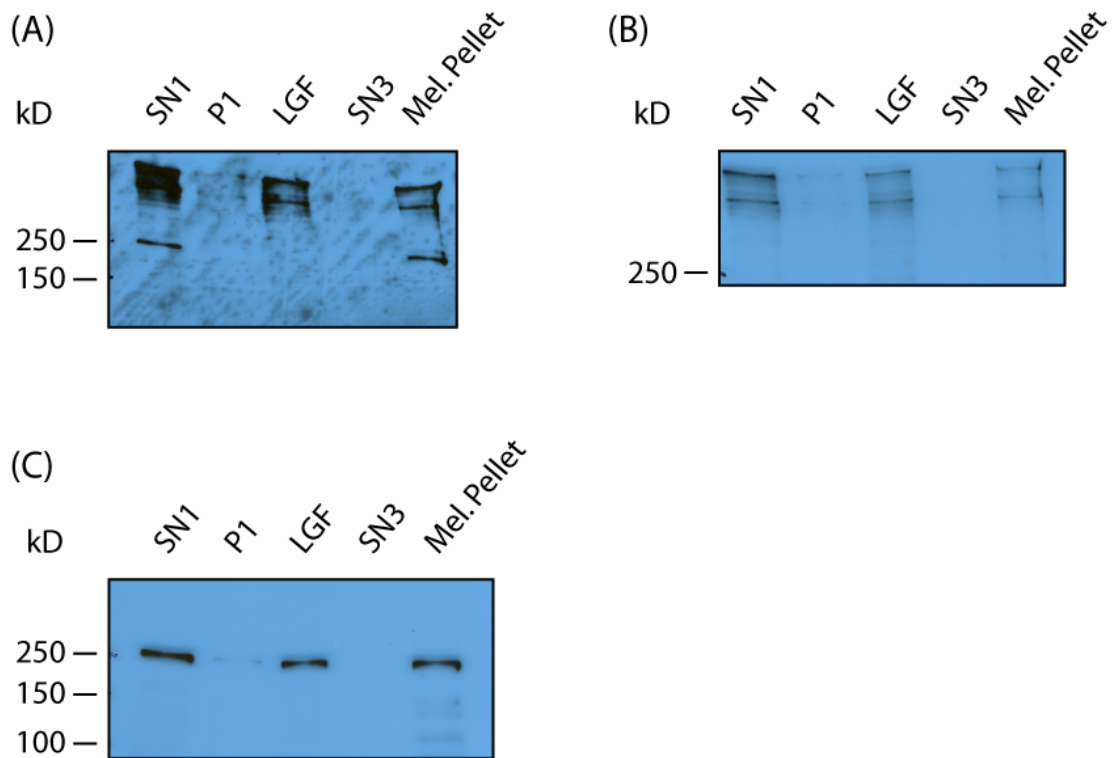


Abbildung 29. Western-Blot Analyse von Proben der subzellulären Fraktionierung.

IBMX/ α MSH differenzierte B16F1 Zellen wurden einer subzellulären Fraktionierung unterzogen und die einzelnen Fraktionen auf das Vorkommen von Plectin, Isoform 1c und Myosin Va untersucht. (A) Western-Blot unter Verwendung von Antiserum gegen alle Plectin-Isoformen (Serum #9) (B) Antikörpern gegen Plectin-Isoform 1c (C) und Antiserum gegen Myosin Va (7p23). Der Überstand (SN1) und das Pellet (P1) der ersten Zentrifugation, der Überstand (SN3) und das Pellet (LGF) des dritten Zentrifugationsschrittes wurden auf 10% PA-Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele mittels Western-Blot auf das Vorhandensein von Plectin, Isoform 1c und Myosin Va geprüft.

Aus Abbildung 29 ist klar ersichtlich, dass sowohl Antiserum #9 als auch Plectin 1c isoformspezifischer Antikörper, sowie Myosin Va Antikörper 7p23 entsprechende Proteine im Melanosomenpellet erkannten. Dieses Ergebnis zeigte, dass in B16F1 Zellen zumindest eine Fraktion Plectin 1c mit Melanosomen assoziiert ist.

3.2. *Interaktion des N-Terminus von Plectin mit Tubulin/MT*

Ist die vom Plectin Exon 1c kodierte Aminosäuresequenz direkt für die Interaktion mit MT verantwortlich?

Wie in dieser Arbeit (Abb. 23) demonstriert werden konnte, zeigten B16F10 Melanomazellen eine partielle Colokalisation von Plectin 1c mit MT. Ähnliche Beobachtungen waren auch zuvor schon in Keratinocyten gemacht worden (Andrä *et al.*, 2003), wobei nur Plectin 1c, aber keine andere Isoform Colokalisation mit MT gezeigt hatte. Des Weiteren war eine Cosedimentation von endogenem Plectin 1c mit aus Keratinocyten und Neuroblastomazellen stammenden MT beobachtet worden (G. Walko, unpublizierte Daten).

MAP2/1	V	K	S	K	I	G	S	T	D	N	I	K	Y	Q	P	K	G	G
MAP2/2	V	T	S	K	C	G	S	L	K	N	I	R	H	R	P	G	G	G
MAP2/3	A	Q	A	K	V	G	S	L	D	N	A	H	H	V	P	G	G	G
Tau1	V	K	S	K	I	G	S	T	E	N	L	K	H	Q	P	G	G	G
Tau2	V	T	S	K	C	G	S	L	G	N	I	H	H	K	P	G	G	G
Tau3	V	Q	S	K	I	G	S	L	D	N	I	T	H	V	P	G	G	G
MAP4/1	V	R	S	K	V	G	S	T	E	N	I	K	H	Q	P	G	G	G
MAP4/2	V	S	S	K	C	G	S	K	A	N	I	K	H	K	P	G	G	G
MAP4/3	A	Q	A	K	V	G	S	L	D	N	V	G	H	L	P	A	G	G
MAP4/4	A	P	A	S	A	S	G	L	S	G	H	T	T	L	A	G	G	G
Plec1c	L	P	W	N	L	G		K	T	Q	R	S	R	R	S	G	G	G

Abbildung 30. Sequenzvergleich der repetitiven MT-Bindungssequenzen der MT-Bindungsdomänen verschiedener MAPs der MAP2/Tau Familie mit der von Plectin Exon 1c codierten AS-Sequenz.

Rot: Basische AS. Blau: ungeladene Polare AS; Serin oder Threonin. Schwarz hinterlegt: Idente AS an genauer Position. Dunkelgrau hinterlegt: polare/unpolare Seitenketten an konservierter Stelle. Hellgrau hinterlegt: Konservierte Lysin Reste

Um zu analysieren, ob die vom Plectin Exon 1c kodierte AS-Sequenz als MT-Bindungsmotiv fungieren könnte, wurde zunächst ein Sequenzvergleich mit MT-Bindungsdomänen von MAPs durchgeführt. Interessanterweise zeigte die von der Plectin Exon 1c-kodierte Sequenz tatsächlich eine Ähnlichkeit zu den MT-Bindungsdomänen von Proteinen der MAP2/Tau Familie (Abb. 30).

Die von Plectin-Exon 1c kodierte AS-Sequenz vermittelt alleine keine spezifische Bindung an MT.

Vorversuche hatten bereits gezeigt, dass N-terminale Plectinproteinfragmente, welche die Exon 1c-kodierten Sequenzen beinhalten, in vitro stärker mit MT cosedimentierten, als Proteinfragmente, die Exon 1a-kodierte Sequenzen enthielten (L. Janda, nicht publizierte Daten). Allerdings war in diesen Experimenten nie auf das Vorhandensein von korrekt ausgeformten MT geachtet worden. Wie sich später herausstellte, war in den Vorversuchen nur mit aggregiertem Tubulin anstatt intakten MT gearbeitet worden.

Um zu prüfen, ob die Plectin-Exon 1c-kodierte Sequenz tatsächlich eine direkte Bindung von Plectin an intakte MT vermitteln kann, wurden erneut rekombinant hergestellte Proteinfragmente der Actin-Bindungsdomänen der Plectin-Isoformen 1c und 1a, kodiert von Exons 1c-8, bzw. 1a-8, auf Cosedimentation mit MT untersucht. Bei jedem Experiment wurde die Qualität der erzeugten MT mittels EM kontrolliert (Abb. 31).

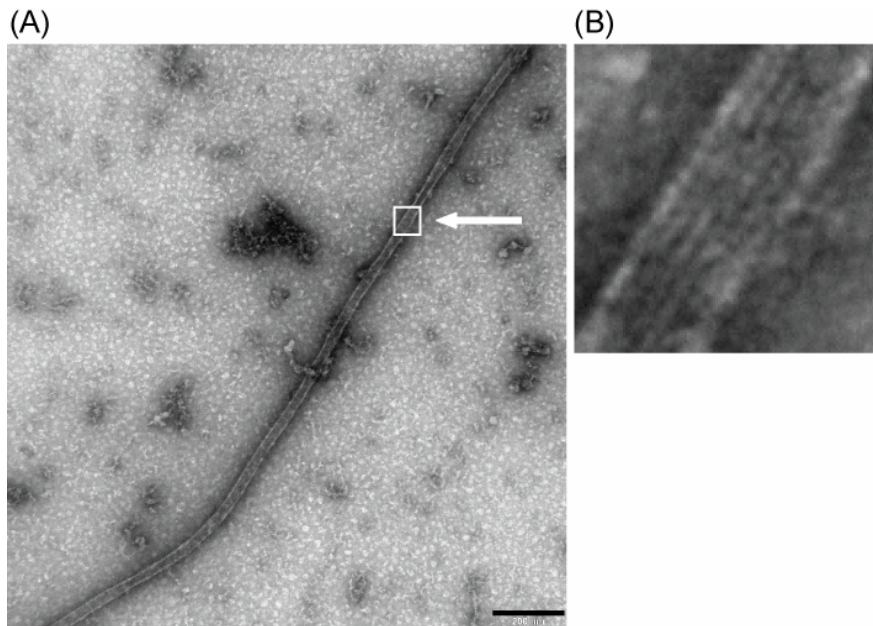


Abbildung 31. EM von in vitro polymerisierten MT

(A) Gesamtaufnahme eines Mikrotubulus. (B) Vergrößerung des Ausschnittes links. Deutlich sind einzelne Protofilamente zu erkennen. Balken: 200 nm.

Zuerst sollte die Bindungsfähigkeit der Plectin-Proteinfragmente P1c-8 und P1a-8 an MT überprüft werden. Um einen etwaigen Sättigungseffekt der Bindung verschiedener Plectin-Isoformen an MT zu beobachten, wurden die Cosedimentationen mit MT und den Plectin Proteinfragmenten P1c-8/P1a-8 in den molaren Verhältnissen 1:3, 1:5 und 1:7 durchgeführt. Die Abbildung 32 zeigt Gelfotos dieser Experimente.

Wie aus Abbildung 32 ersichtlich, ließ sich für Plectin 1a-8 sowie für Plectin 1c-8 nur eine relativ schwache Cosedimentation mit Tubulin beobachten. Im Falle von Plectin 1a-8 zeigte sich ein leichter Sättigungseffekt bei der Cosedimentation, d.h. bei niedriger Konzentration von P1a-8 (molares Verhältnis MT:P1a-8 = 1:7) sedimentierte im Vergleich zu dem Versuch im molaren Verhältnis 1:3 mehr Protein mit MT (Abb. 32, C). Dies war bei P1c-8 nicht der Fall (Abb. 32, A, B). Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass Plectin 1a-8 deutlich stärker als 1c-8 dazu neigte, selbst zu aggregieren und auch in der Kontrolle (ohne Tubulin) teilweise als Sediment zu finden war (Abb. 32, B, C).

In einem nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die Zentrifugationsgeschwindigkeit die Cosedimentationsresultate beeinflussen könnte. Dazu verglichen wir Zentrifugationen bei 13.762 x g und 100.000 x g. In Abbildung 33 wurden die Plectin-Proteinfragmente P1c-8, P1a-8 und P2-8 (ABD ohne N-terminale Isoform-spezifische Sequenz) miteinander verglichen. Wie ersichtlich, polymerisierte das Tubulin nur sehr schlecht aus, daher wurde der Versuch wiederholt. Da sich bei Zentrifugationsgeschwindigkeiten von 13.762 x g gegenüber 100.000 x g kein Unterschied im Sedimentationsverhalten der MT zeigte, wurde für weitere Experimente die niedrigere Zentrifugationsgeschwindigkeit gewählt.

Abbildung 34 gibt die Wiederholung des Versuchs mit gut auspolymerisiertem Tubulin wieder. Alle drei Plectin Isoform-ABD Fragmente zeigten ähnlich schwache Cosedimentation. Auch in diesem Versuch war gut zu erkennen, dass P1a-8 auch in der Kontrolle leicht aggregierte und somit auch in der Kontrolle im Pellet zu finden war.

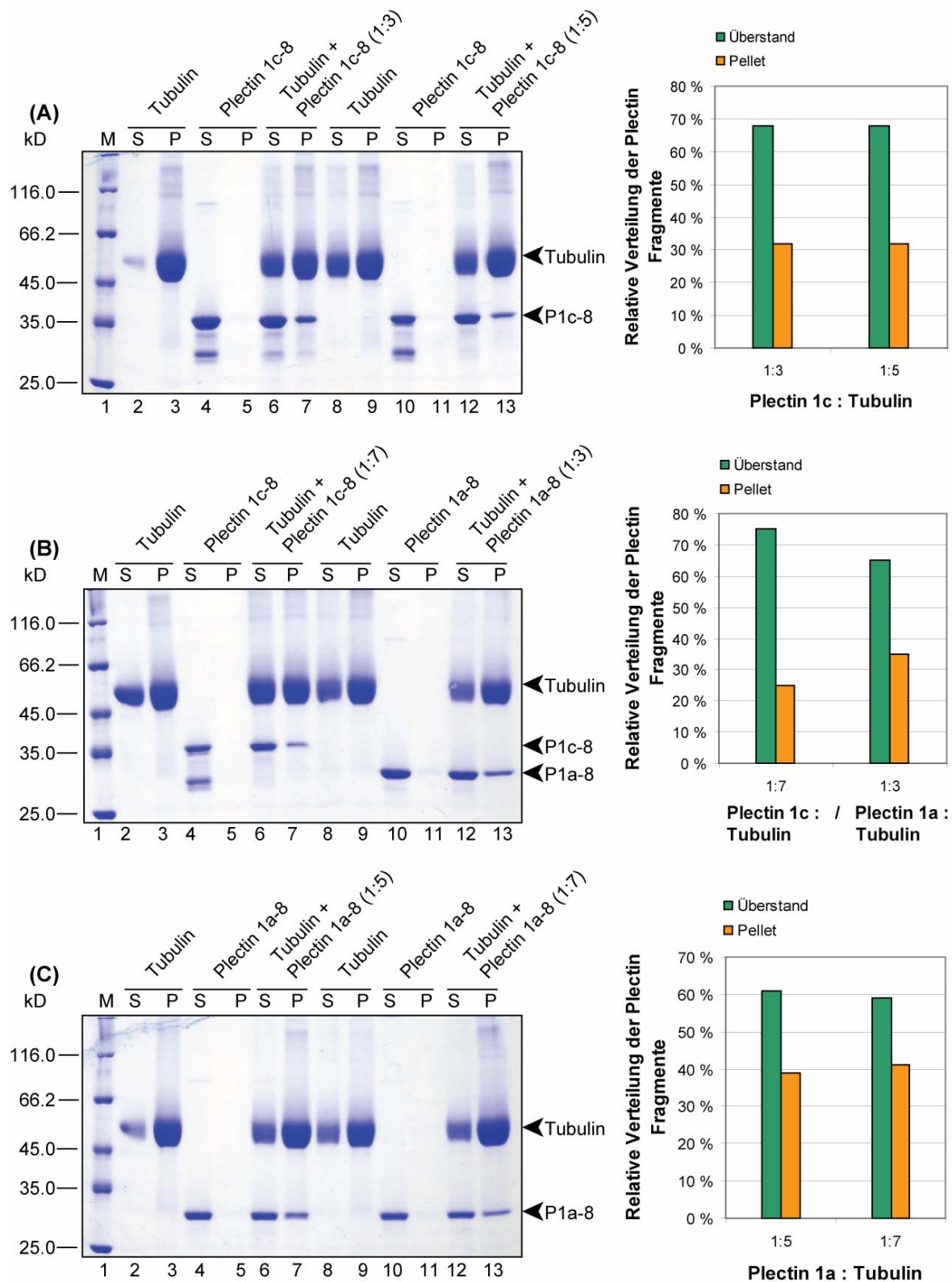


Abbildung 32. Cosedimentation von unterschiedlichen Plectin-Isoform N-Termini mit MT.

Um zu überprüfen, ob es zu konzentrationsabhängigen Sättigungseffekten bei der Cosedimentation kommt, wurden die Plectin Proteinfragmente P1c-8 und P1a-8 in den molaren Verhältnissen 1:3, 1:5, und 1:7 (Plectin Protein zu Tubulin) Cosedimentationen unterzogen. (A) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-7, P1c-8/MT in den molaren Verhältnissen, 1:3/1:5. (B) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-13, P1c-8/MT in dem molaren Verhältnis, 1:7; Spuren 8-13, P1a-8/MT in dem molaren Verhältnis 1:3 (C) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-13, P1a-8/MT in den Molaren Verhältnissen 1:5/1:7. Proben der Pellet (P) Überstand (S) Fraktionen wurden elektrophoretisch auf 10% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Die Gele wurden gescannt und densitometrisch ausgewertet.

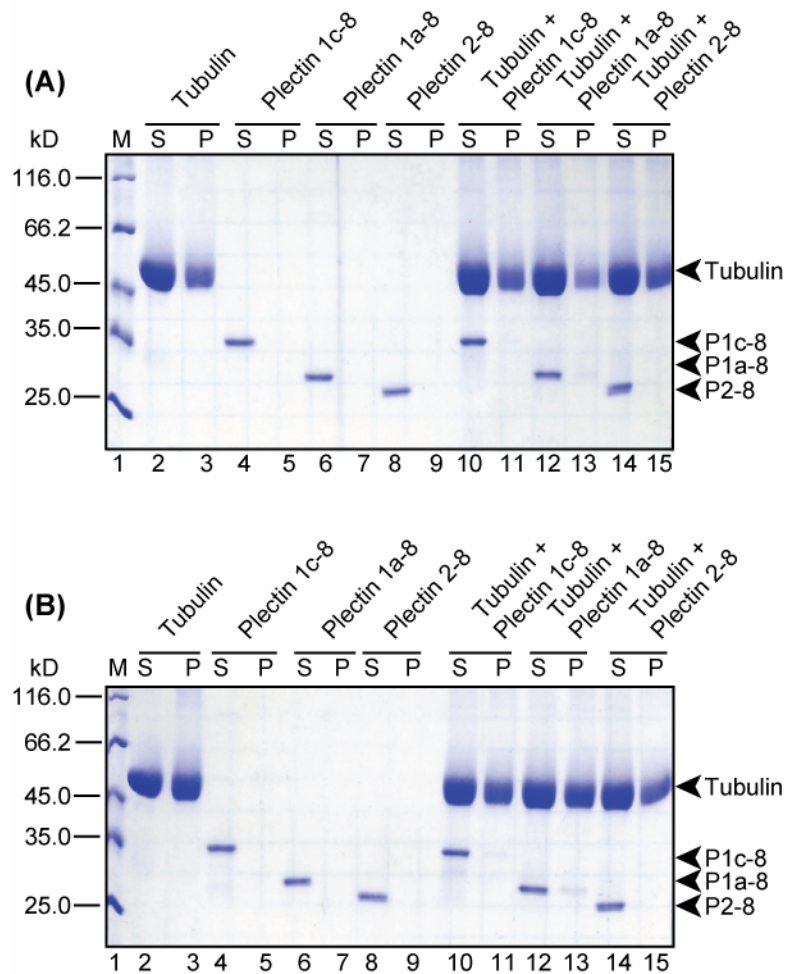


Abbildung 33. Cosedimentation von Plectin (Isoform) ABD-Proteinfragmenten mit MT bei unterschiedlicher Zentrifugationsgeschwindigkeit

Die Plectin Proteinfragmente 1c-8, 1a-8 und 2-8 wurden im molaren Verhältnis 1:10 zu Tubulin auf ihre Cosedimentationsfähigkeit bei niedriger und bei hoher Zentrifugationsgeschwindigkeit getestet.

13.762xg, 30min (A) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-9 Kontrollen; 10-15 Tubulin und Plectin-Isoform-Gemische. 100.000xg, 30min (B). Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-9 Kontrollen; 10-15 Tubulin und Plectin-Isoform-Gemische. Proben der Pellet- (P) und Überstand- (S) Fraktionen wurden elektrophoretisch auf SDS-10% PA-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Die Gele wurden gescannt und densitometrisch ausgewertet.

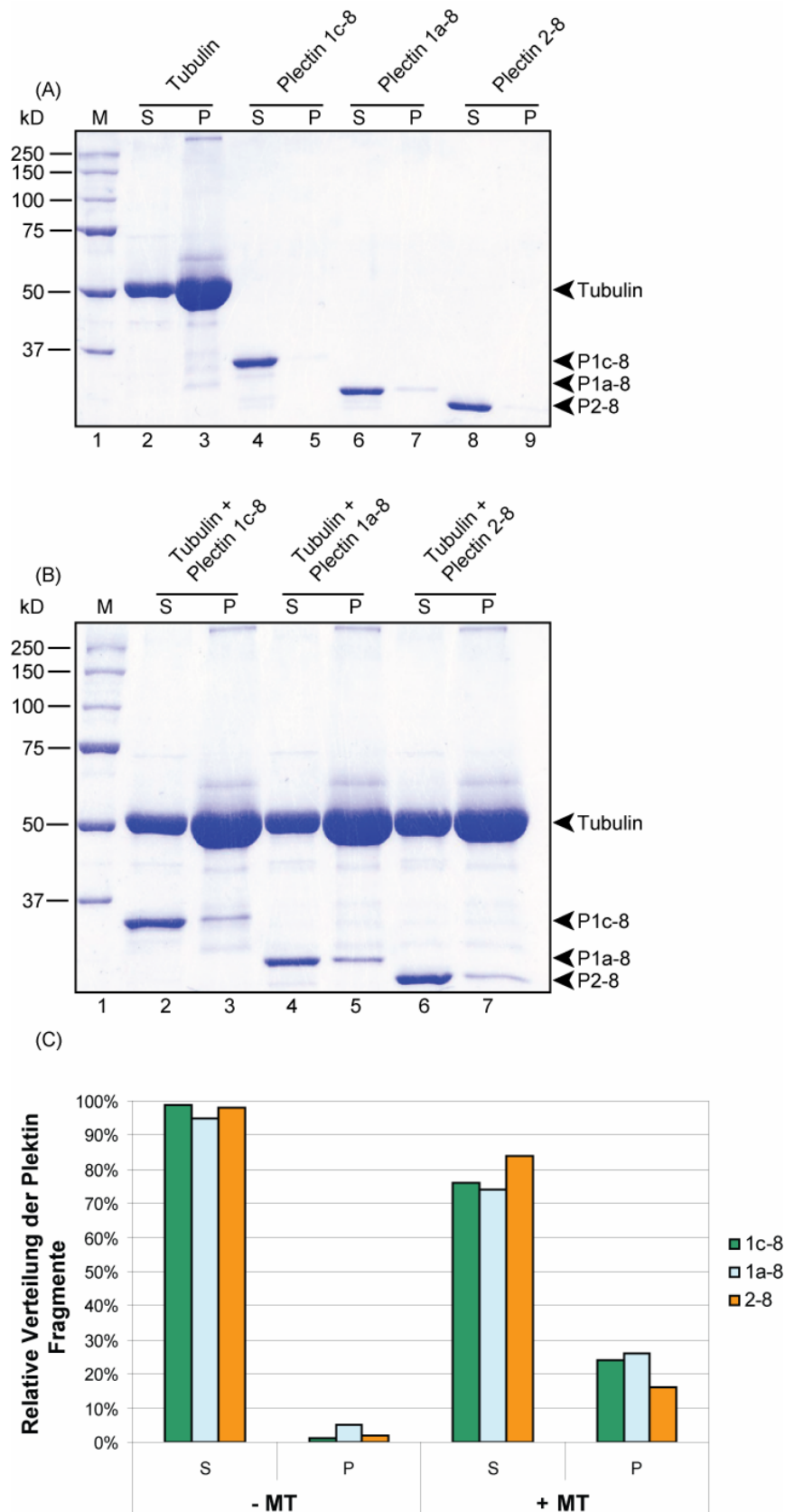


Abbildung 34 Cosedimentation verschiedener Plectin (Isoform)-ABD Proteinfragmente mit MT.

Cosedimentation von Tubulin mit den Plectin Fragmenten 1c-8,1a-8 und 2-8 in den Verhältnissen 1:10:10:10

(A) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-9, Kontrollen.(B) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-7,

Cosedimentation der verschiedenen Plectin-Isoformen mit MT (C) Statistische Auswertung der Verteilung der

Plectin ABD-Proteinfragmente in Überstand und Pellet-Fractionen. Proben der Pellet (P) Überstand (S)

Fractionen wurden elektrophoretisch auf 10% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau

angefärbt. Die Gele wurden eingescannt und mittels Densitometrie ausgewertet.

Die Plectin-Isoform 1c-spezifische ABD bindet nicht an Tubulin-Protofilamente.

Im Bezug auf das in den ursprünglichen Cosedimentationsexperimenten verwendete Tubulin war gezeigt worden, dass es, wenn es über einen längeren Zeitraum auf -80°C gelagert wird, seine Fähigkeit zur Ausbildung stabiler Mikrotubuli verliert. Anstelle dessen fängt es an zu aggregieren und Zink-Blatt ähnliche Strukturen auszuformen (Lubomir Janda, unveröffentlichte Daten). Auf diese Daten aufbauend sollte untersucht werden, ob das Plectin-Proteinfragment P1c-8 eine vorzugsweise mit Tubulin-Protofilamenten interagiert. Um sicherzustellen, dass das verwendete Tubulin intakt, d.h. voll polymerisationsfähig, war, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von dem in Versuch eingesetzten Material gemacht (Abb. 35, A). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass es keine Bindung von P1c-8 oder P1a-8 an Tubulin Protofilamente gibt. (Abb. 35, B; und 36).

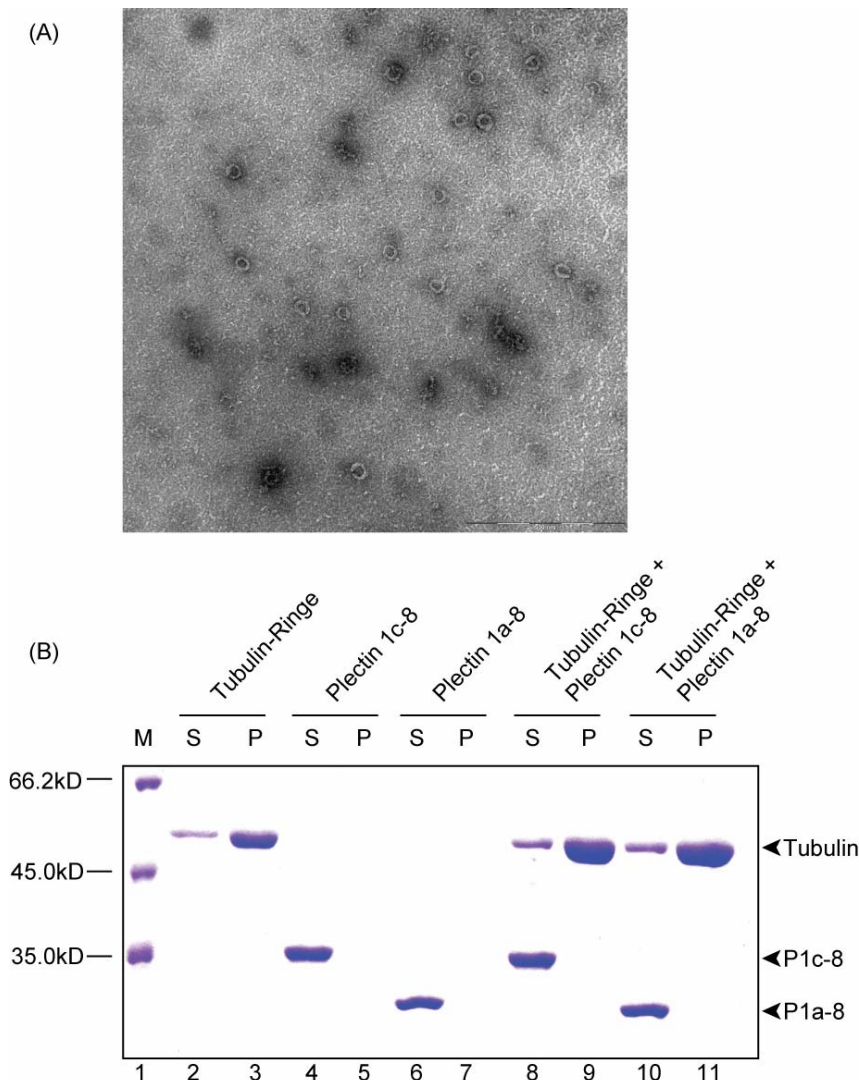


Abbildung 35. Cosedimentation von Plectin-Proteinfragmenten mit Tubulin-Ringen.

Um die Interaktion mit Tubulin Protofilamenten zu testen, wurden Cosedimentationen von Plectin-Isoformen und Tubulin-Ringen durchgeführt. (A) Um sicherzustellen, dass die Cosedimentation tatsächlich mit Tubulin Ringen durchgeführt wurde, wurde das vermeintlich Tubulin-Ringe enthaltende Material vor der Cosedimentation mittels Elektronenmikroskopie überprüft. Deutlich waren Tubulin Ringe zu erkennen. Balken: 500 nm. (B) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-7, Kontrollen; Spuren 8-11, Cosedimentationen.

In einem weiteren Experiment sollte versucht werden, stabile MT mittels Kälte-depolymerisation teilweise zu Protofilamenten zu depolymerisieren. Zu diesem Zweck wurde das zu Mikrotubuli polymerisierte Tubulin bei 4° C für eine Stunde inkubiert. Auf diese Weise sollte eine Vielzahl verschiedener Tubulin-Strukturen in dem für die Cosedimentation eingesetzten Tubulinmaterial geschaffen werden. Auch hier konnte keine Interaktion des Plectins mit Tubulinpolymeren beobachtet werden (Abbildung 35). In einem letzten Experiment sollte die Cosedimentation mit Zink-Blättern geprüft werden.

Hier ergab sich jedoch das Problem, dass das von uns verwendete Tubulin in GTP hältigem Puffer gelagert wurde und für die Ausbildung von Zink-Blättern ein GDP Puffer benötigt wurde. Wie sich herausstellte war es nicht möglich, das Tubulin mittels Bio Rad Microspin columns umzupuffern, ohne eine erhebliche Menge an Ausgangsmaterial zu verlieren, da das Tubulin dabei aggregierte. Um das Experiment mit den Zink-Blättern durchzuführen, wäre es nötig gewesen Tubulin erneut aus Schweinehirnen zu isolieren. Da jedoch dieses Material für die restlichen Experimente nicht geeignet gewesen wäre, wurde von einer Durchführung der Cosedimentationen mit Zink-Blättern abgesehen.

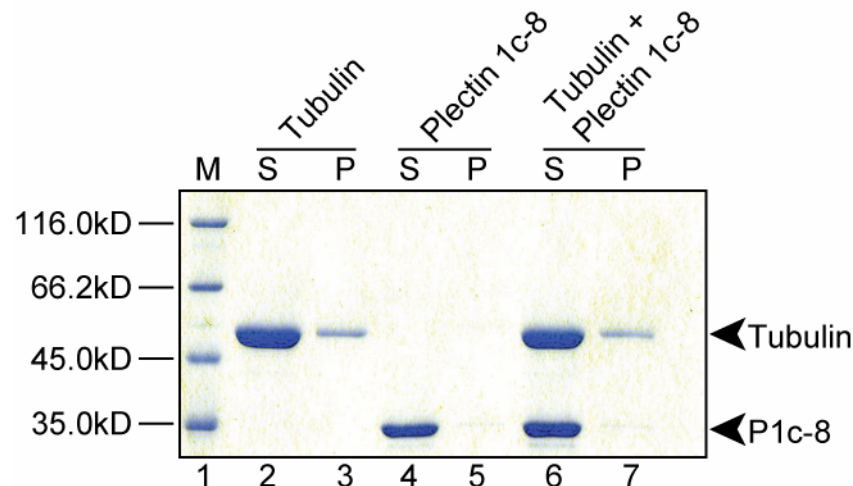


Abbildung 36. Cosedimentation verschiedener Plectin-ABD Fragmente mit Tubulin.

Cosedimentation von Tubulin mit Plectin Fragment 1c-8 im molaren Verhältnis 1:3

Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-5, Kontrollen; Spalten 6 und 7, Cosedimentation. Proben der Pellet- (P) und Überstand- (S) Fraktionen wurden elektrophoretisch auf SDS-10% PA-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Alternatives RNA-Splicing in neuronalen Geweben generiert eine Plectin-Isoform 1c-spezifische ABD mit MT-Bindungseigenschaften.

RNAse Protektionsanalysen in neuronalen Geweben hatten gezeigt, dass exklusiv in neuronalen Geweben durch alternatives Spleißen eine Plectin 1c-Isoform generiert wird, deren ABD 2 zusätzliche kurze AS-Sequenzen enthält, welche von den Plectin-Exons 2 α und 3 α codiert werden (Fuchs *et al.*, 1999). Ein Proteinfragment, welches von den Plectin-Exons 1c-8 kodiert wird und die von den Exons 2 α und 3 α kodierten Exons beinhaltetete [P1c-8(2 α 3 α)], wurde rekombinant hergestellt, um die Cosedimentationseigenschaften eines dieser Isoformvariante entsprechenden Fragments, im Vergleich zu denen von P1c-8 und P1a-8

(jeweils ohne 2 α , 3 α) zu untersuchen. Wie sich herausstellte, zeigte P1c-8(2 α 3 α) eine deutlich stärkere Cosedimentation mit MT (48% des Proteins waren in der Pellet Fraktion zu finden), als dasselbe Proteinfragment ohne die Exon 2 α - und 3 α - kodierten Sequenzen (P1c-8), bei denen nur 15% des Proteins in der Pellet Fraktion zu finden waren. Auch P1a-8 cosedimentierte deutlich schlechter als P1c-8(2 α 3 α) (31% des Proteins waren in der Pellet Fraktion zu finden) (Abb. 37, B). Von diesen Resultaten konnte abgeleitet werden, dass die von den Exons 2 α - und 3 α - kodierten Sequenzen in Kombination mit der Exon 1c-kodierten Sequenz zu Ausbildung einer optimalen MT-Bindungsdomäne führten.

In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob die Exon 2 α - und 3 α -kodierten Sequenzen alleine die Bindung der Plectin ABD an MT modulieren können, oder ob die Plectin Exon 1c-kodierte Sequenz ebenfalls benötigt wird. Zu diesem Zweck wurden die Cosedimentationseigenschaften der rekombinant hergestellten Proteinfragmenten P1c-8(2 α 3 α) und P2-8(2 α 3 α) miteinander verglichen. Wie in Abb. 38 zu erkennen ist, zeigte Plectin Protein Fragment P1c-8(2 α 3 α) eine stärkere Bindung mit MT (43% des Proteins waren in der Pellet Fraktion zu finden), als P2-8(2 α 3 α), welches keine Exon 1c-codierte Sequenz enthielt und bei dem nur 35% des Proteins in der Pellet Fraktion zu finden waren.

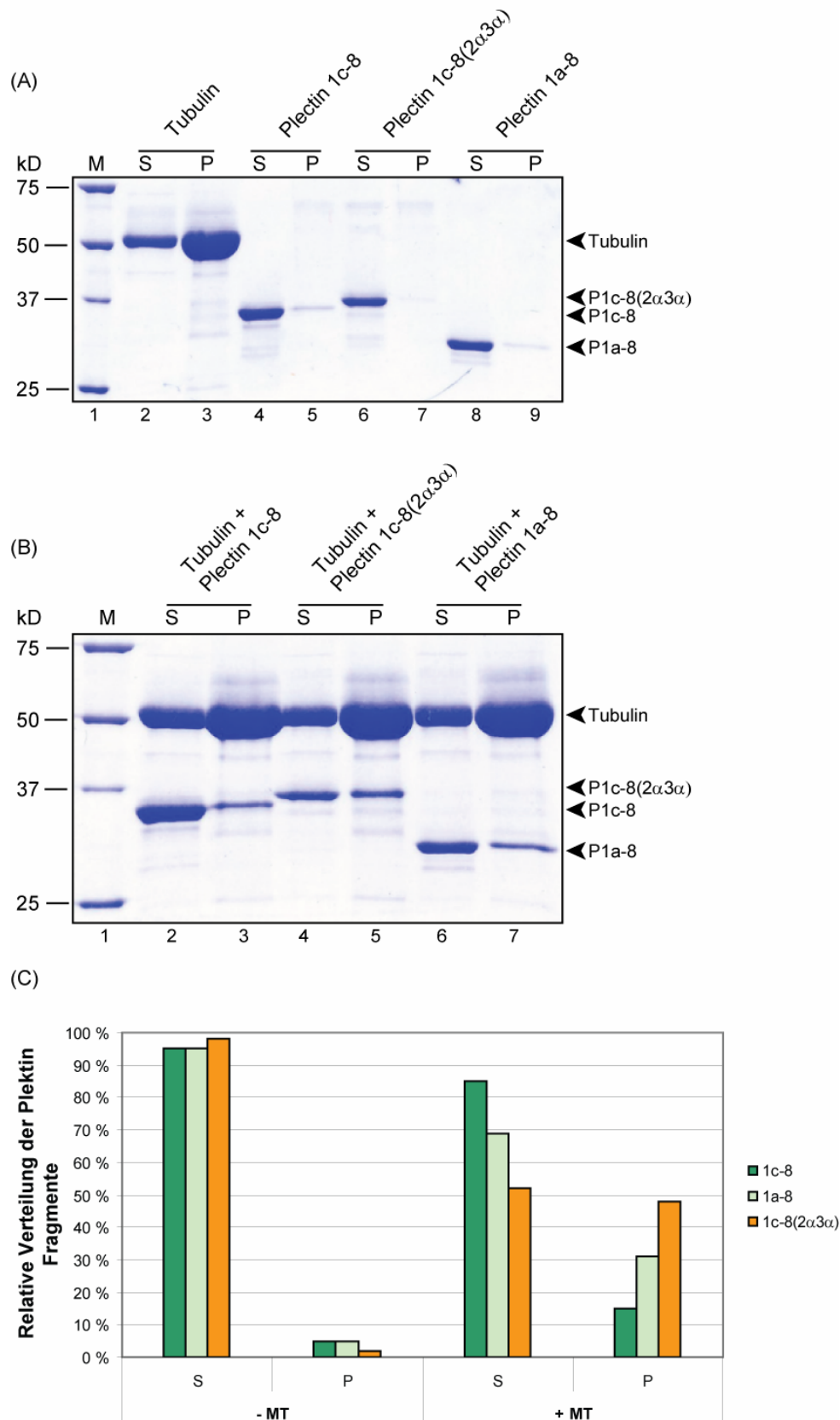


Abbildung 37. Cosedimentation von unterschiedlichen Plectin-Proteinfragmenten mit MT.

Die Plectin-Proteinfragmente P1c-8, P1c-8(2α3α), P1a-8 wurden mit Tubulin im molaren Verhältnis 1:10 auf Cosedimentation getestet. (A) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-9, Kontrollen. (B) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-7, Cosedimentationen. Proben der Pellet (P) Überstand (S) Fraktionen wurden elektrophoretisch auf SDS-10% PA-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die Gele wurden gescannt und densitometrisch ausgewertet (C).

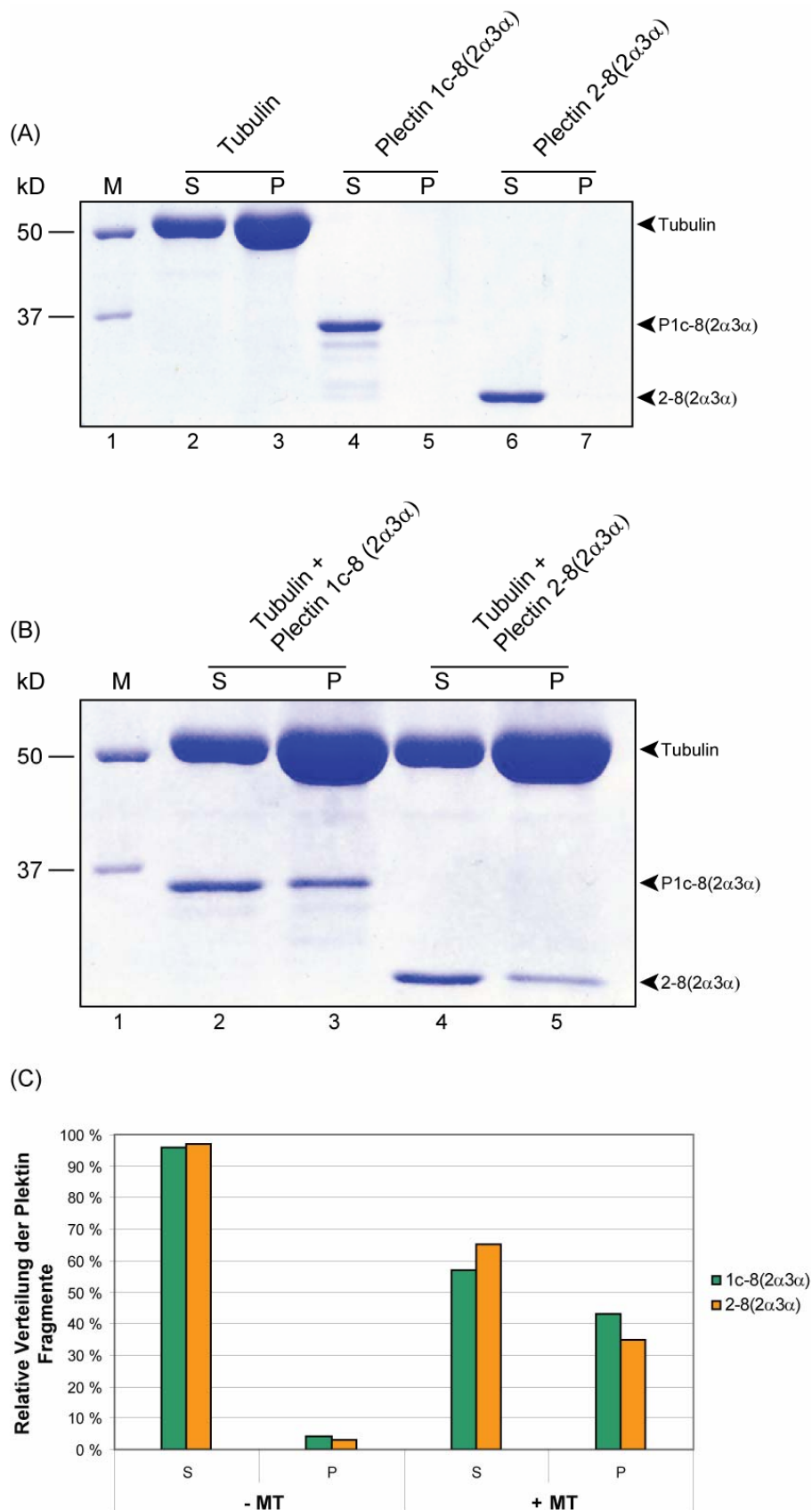


Abbildung 38. Cosedimentation unterschiedlicher Plectin-Proteinfragmente mit MT

Die Plectin Isoform ABD Proteinfragmente 1c-8(2α3α) und 2-8(2α3α) wurden mit Tubulin im molaren Verhältnis 1:10 auf Cosedimentation getestet. (A) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-7, Kontrollen. (B) Spur 1, Proteinstandard (M); Spuren 2-5, Cosedimentationen. Proben der Pellet (P) Überstand (S) Fraktionen wurden elektrophoretisch auf SDS-10% PA-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die Gele wurden gescannt und densitometrisch ausgewertet (C).

Zusammengefasst konnte mit den Cosedimentationsexperimenten gezeigt werden, dass nur die Kombination von Aminosäure-Sequenzen, welche von den Plectin Exons 1c, 2 α und 3 α codiert werden, optimale Bindung der Plectin ABD an MT vermitteln. Alle Cosedimentationsdaten sind statistisch ausgewertet in Abb. 39 dargestellt. Ein direkter Vergleich der einzelnen Cosedimentationen zeigt sehr anschaulich, dass das Vorhandensein von Exon 1c mit den Sequenzen der Exons 2 α - und 3 α - zusammen zu einer sichtbaren Verstärkung der Interaktion zwischen MT und Plectin führt.

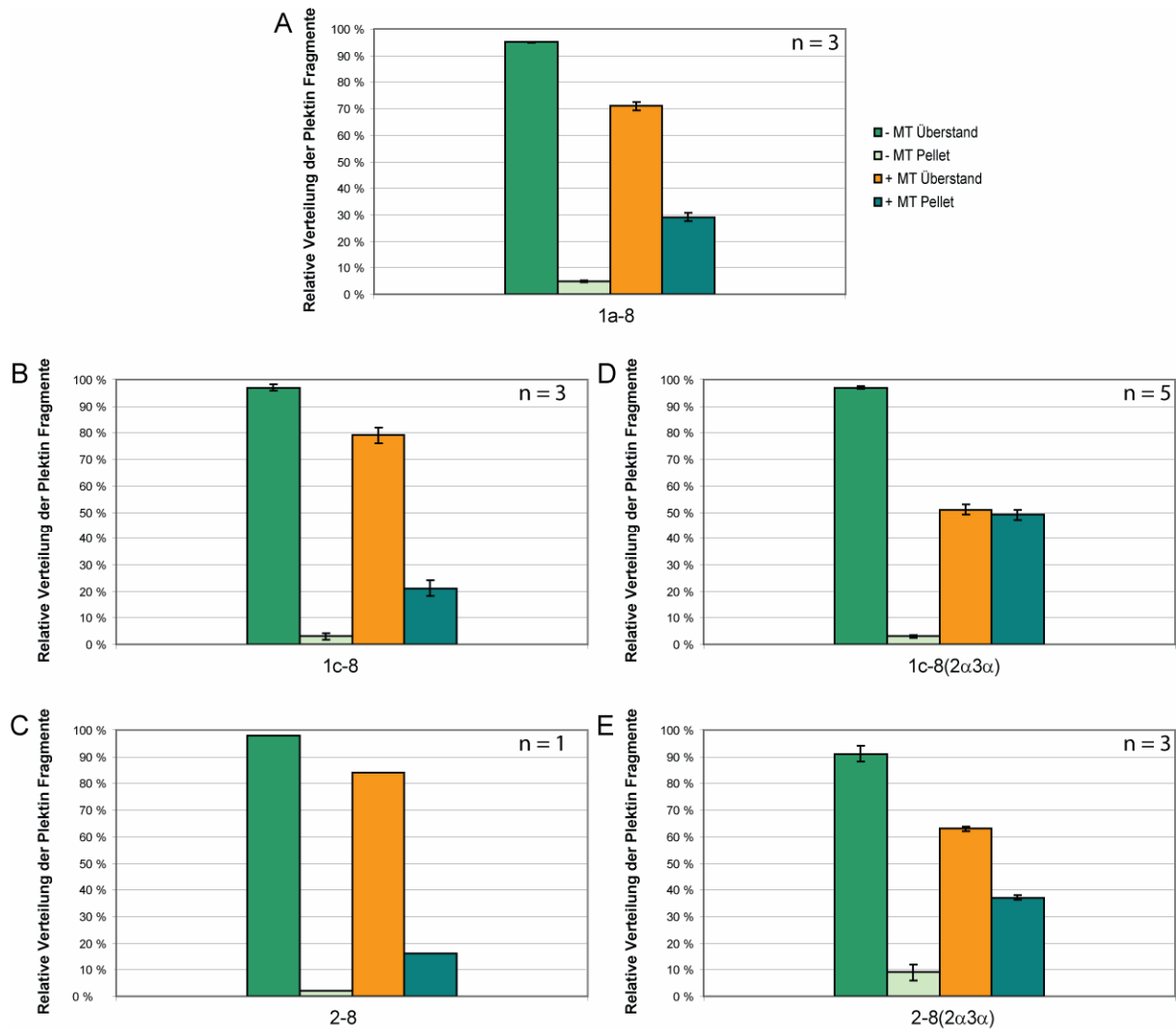


Abbildung 39. Vergleich der Interaktion verschiedener Plectin Fragmente mittels densitometrischer Auswertung von PA-Gelen.

In allen Diagrammen repräsentiert der grüne Balken den Überstand (S) und der blassgrüne Balken das Pellet (P) der Kontrollen (ohne MT). Der gelbe Balken repräsentiert den Überstand (S) und der blaue Balken das Pellet (P) der Cosedimentation (mit MT). (A) P1a-8. (B) P1c-8. (C) P2-8. (D) P1c-8(2 α 3 α). (E) P2-8(2 α 3 α). Mittelwerte \pm dem Standardfehler werden gezeigt. n: Anzahl d. Experimente.

4. Diskussion

Auch die Diskussion dieser Arbeit teilt sich durch die Aufgabenstellung in zwei Teile. In Kapitel 4.1 werden die Ergebnisse zur Lokalisation von Plectin 1c in Melanocyten diskutiert, während in Abschnitt 4.2 die Plectin 1c-MT Interaktion abgehandelt wird.

4.1. Subzelluläre Lokalisation von Plectin 1c in Melanocyten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in B16F10 Melanomazellen Plectin 1c zwar vorwiegend mit Actin-Strukturen colokalisiert, sehr wohl aber auch mit MT assoziiert ist. Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt worden war, konnte eine Colokalisation von Plectin 1c mit MT sowohl in Keratinocyten (*Andrä et al., 2003*), als auch in murinen Neuroblastom Zellen (N2A) (*G. Walko, nicht publizierte Daten*) beobachtet werden. Des Weiteren war eine Cosedimentation von endogenem Plectin 1c mit MT aus Maus- und Schweinegehirn, N2A-Zellen und Keratinocyten nachgewiesen worden (*G. Walko, nicht publizierte Daten*).

Besonders auffällig ist, dass Plectin 1c unter pro-melanogenen Kulturbedingungen in die stark verästelten Dendritenspitzen der B16F10 Zellen transportiert wird, wo es mit Myosin Va colokalisiert, jedoch kein Tubulin mehr nachzuweisen ist. Dieses Verhalten ist für uns besonders deshalb von Bedeutung, weil an diesen Dendritenspitzen in weiterer Folge der Export der Melanosomen in die benachbarten Keratinocyten stattfindet (ein nach wie vor nicht vollständig aufgeklärter Prozess). Vor allem aber ist es deshalb interessant, weil an der Zellperipherie der Wechsel von tubulinabhängigem- auf aktinabhängigen Transport erfolgt. Besonders im Licht des zweiten Teils der Arbeit, der sich mit der Plectin 1c-MT Interaktion befasst, ist dieses Verhalten von Interesse.

Der Prozess des interzellulären Transports von Melanosomen aus den Melanocyten dendriten in die benachbarten Keratinocyten ist bis heute nicht restlos aufgeklärt (*Wasmeier et al., 2008*). Auch bei diesem Prozess besteht die Möglichkeit einer Beteiligung von Plectin.

Interaktion von Plectin 1c mit Melanosomen

Mittels Immunofluoreszenz Mikroskopie konnte, wie bereits oben erwähnt, gezeigt werden, dass es in B16F10 Zellen unter pro-melanogenen Kulturbedingungen zu einer Reorganisation der Verteilung von Plectin kommt. Unter pro-melanogenen Bedingungen wurden sowohl das Melanosomen-assoziierte Motorprotein Myosin Va, als auch Plectin in den dendritischen Fortsätzen der Zellen angereichert. Zusätzlich konnte mittels subzellulärer Fraktionierung gezeigt werden, dass zusammen mit den Melanosomen der B16F10 Zellen Myosin Va und Plectin aufgereinigt werden kann. Auch wenn beide Methoden keinen direkten Nachweis erbringen können, dass es eine direkte Interaktion zwischen Plectin und Myosin Va bzw. Melanosomen gibt, so zeigen die Ergebnisse doch, dass es zu einem gemeinsamen räumlichen Auftreten der einzelnen Komponenten kommt. Aus den Daten, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, könnte folgendes Modell bezüglich der Rolle von Plectin 1c im Melanosomentransport vorgeschlagen werden: Plectin 1c, das vermutlich eine Rolle im Melanosomentransport entlang des Actin/MT Cytoskeletts spielt, wird unter pro-melanogenen Kulturbedingungen zusammen mit Myosin Va in den Dendritenspitzen angereichert, wo es als

Modulator der Cytoarchitektur des Actincytoskeletts eine Rolle beim Export von Melanosomen aus den dendritischen Fortsätzen spielen könnte.

4.2. P1c-MT-Bindung

Wie bereits zuvor angemerkt wurde, interagiert Plectin 1c in verschiedenen Zellen/Geweben mit MT. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Plectin 1c Expression in B16F10 Melanomazellen unter verschiedenen Kulturbedingungen unterschiedlich reguliert wird und dass vor allem unter pro-melanogenen Kulturbedingungen die Plectin 1c Expression stark erhöht ist.

Drei MT-Bindungsdomänen sind für Proteine der Plakin-Familie beschrieben worden.

- I. Die so genannte GAS-Sequenz stellt eine funktionelle MT Interaktionsdomäne dar. Diese kommt allerdings nur in den verschiedenen Isoformen von BPAG1 und ACF7 vor, nicht aber in Plectin.
- II. Für die so genannte M1 Domäne von ACF7 und BPAG1 konnte zwar Interaktion mit MT nachgewiesen werden, allerdings nur mit rekombinant hergestellten Proteinfragmenten, welche nur die M1 Domäne beinhalten. Größere Proteinfragmente der M1 Domäne mit den die M1 Domäne umgebenden Sequenzen zeigten keine Interaktion mit MT (*Sun et al., 2000*).
- III. Für die C-Terminalen GSR-Repeats, welche in BPAG1, ACF7 und Plectin vorkommen, war gezeigt worden, dass sie bei Transfektion in Cos7 Zellen MT dekorieren und sogar bündeln können (*Sun et al., 2000*), was auf eine direkte MT-Bindung hinweist. Allerdings zeigte sich bei Wiederholung desselben Experiments mit einem ähnlichen C-terminalen Plectinfragment keine Dekoration von MT (*G. Walko, nicht publizierte Daten*). Die ursprünglichen Daten von Sun et al. sind daher in Frage zu stellen.

Da diese drei Domänen im Falle von Plectin nicht für die Interaktion mit MT verantwortlich sind, könnten die Daten, die im Zuge dieser Arbeit beziehungsweise in vorangegangenen Arbeiten dieser Gruppe generiert wurden, eine Erklärung für diese Interaktion liefern. Die Sequenzhomologie zwischen der von Plectin Isoform 1c-codierten Sequenz und den MT-Bindungsdomänen von MAPs (siehe Abb. 30) wurde als ein Indiz für die mögliche Interaktion von Plectin 1c mit MT genommen. Betrachtet man die Daten aus den Cosedimentationsexperimenten, kann man jedoch feststellen, dass die von Plectin Exon 1c kodierte Sequenz nicht ausreicht, um eine nennenswerte Assoziation der Plectin ABD mit MT zu bewirken. Betrachtet man die MT Bindungsstellen von MAPs der MAP2/Tau Familie fällt auf, dass diese mehrere Wiederholungen der in Abb. 30 gezeigten Sequenz tragen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Plectin 1c, das nur eine einzige solche Sequenz besitzt, als Oligomer vorliegen muss, um eine stabile MT Interaktion auszulösen. Weiters fehlt der Plectin 1c-kodierten Sequenz ein wichtiger Serin-Rest in den konservierten KXGS MT-Bindungs Wiederholungen, welcher z.B. in MAP2c für die Regulierung der MT-Bindungsaktivität benötigt wird (*Ozer und Halpain, 2000*).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zwei zusätzliche Exons, die ausschließlich in neuronalen Geweben exprimiert werden, den Effekt der Exon 1c-kodierten Sequenz auf die MT Assoziation erheblich verstärken. Die in dieser Arbeit generierten Daten belegen, dass die Exons 2 α und 3 α zusammen mit Exon 1c eine funktionelle Mikrotubulibindungsdomäne

ausbilden. Dies könnte ein Mechanismus zum „fine-tuning“ der Assoziation von Plectin mit dem Cytoskelett in neuronalen Geweben sein. In diesen Geweben wird durch das Zusammenspleißen der drei Exons in die Plectin ABD eine MT Bindungsdomäne erzeugt, die es Plectin in diesen MT-reichen Geweben ermöglicht, mit MT zu interagieren.

Cosedimentation von Plectin-Isoform 1c Proteinfragmenten mit MT war in unserer Arbeitsgruppe schon früher gezeigt worden (L. Janda, nicht publizierte Daten). Bei der Untersuchung unter dem Elektronenmikroskop waren damals aber keine MT zu sehen gewesen, sondern stattdessen dichte, „Zink-Sheet“ ähnliche Tubulin-Strukturen. Diese Daten waren der Grund, warum in dieser Arbeit sowohl Tubulin-Protofilamente als auch MT-Abbauprodukte auf ihre Bindungsfähigkeit mit rekombinant hergestellten Plectin ABD Fragmenten untersucht wurden. Wie jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zeigt kein Plectin-ABD-Fragment Cosedimentation mit anderen Tubulin-Strukturen, als vollständig auspolymerisierten MT. Durch die Fähigkeit, mittels gewebsspezifischem alternativen Spleißen eine N-terminale MT-Bindungsdomäne auszubilden, entsteht im Bereich der ABD der Plectin-Isoform 1c eine Domäne mit zwei Bindungseigenschaften, nämlich sowohl MT-, als auch Actinbindung. In weiterer Folge wäre es interessant zu prüfen, welche Interaktion dieser Domäne stärker ist, und somit in neuronalen Geweben häufiger zu beobachten. Da jedoch in Neuronen vor allem in den Axonen große Mengen an MT und Neurofilamenten vorkommen (*Hirokawa et al., 1988*), wäre es möglich, dass die Generierung einer MT-Bindungsdomäne am Plectin N-Terminus durch alternatives Spleißen einen „fine-tuning“-Prozess in neuronalen Geweben darstellt, um einen MT/Neurofilament „crosslinker“ zu erzeugen. Ein vergleichbares Beispiel für ein Protein mit der Fähigkeit sowohl an MT, als auch an Actinfilamente zu binden, welche durch die selbe Domäne vermittelt werden, ist MAP2c, bei dem es in Abhängigkeit von Phosphorylierung eines Serin-Rests in seiner MT-Bindungsdomäne zur Interaktion mit MT oder Actinfilamenten kommt (*Ozer und Halpain, 2000*).

Abbildung 40 zeigt ein mögliches Modell für die MT-Plectin 1c Interaktion in neuronalen Geweben. Die Exon 1c-, 2 α -, und 3 α -kodierte Sequenzen vermitteln direkte MT-Interaktion, während die SH3-Domäne in Plectins Plakin-Domäne zusätzlich die MT-Interaktion via MAPs vermittelt.

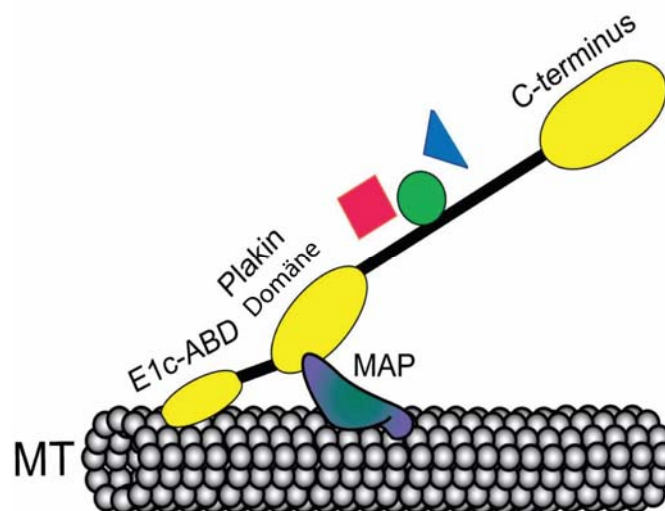


Abbildung 40. Mögliches Modell der MT – Plectin 1c Interaktion in neuronalen Geweben.

Ein mögliches Modell der MT-Plectin 1c Interaktion, basierend auf den in unserer Arbeitsgruppe gewonnenen Daten. Die Plectin-Isoform 1c kann mittels ihrer ABD direkt MT Bindung vermitteln, während die Plakin Domäne von Plectin über Interaktion mit MAPs eine zusätzliche MT-Bindung eingeht.

5. Zusammenfassung

Plectin ist ein >500kDa (Wiche, 1998) großes IF-assoziiertes Protein, welches in der Zelle als cytoskeletttales Verknüpfungsprotein viele Funktionen erfüllt. Durch seine Multi-Domänen Struktur kann Plectin Intermediärfilamente mit Actinfilamenten, sowie MT verknüpfen. Durch alternatives Spleißen des N-Terminus kommt es zu einer gewebsspezifischen Expression der verschiedenen Plectin Isoformen.

Im ersten Teil der Diplomarbeit sollte die subzelluläre Lokalisation der Plectin-Isoform 1c – in B16F10 und B16F1 Melanomzellen, sowie eine mögliche Assoziation dieser Plectin Isoform mit Melanosomen untersucht werden. Um die subzelluläre Verteilung von Plectin 1c zu beobachten, wurden B16F10 und B16F1 Zellen unter pro-migratorischen, pro-melanogenen und normalen Kulturbedingungen kultiviert, anschließend fixiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese Versuche zeigten, dass unter normalen Kulturbedingungen die Plectin-Isoform 1c vor allem mit Actinfilamenten, aber auch partiell mit MT colokalisiert. Unter Wachstumsbedingungen, die die Produktion von Melanosomen fördern (pro-melanogenen Kulturbedingungen), konnte eine Umverteilung von Plectin 1c an die Spitzen dendritischer Fortsätze beobachtet werden, wo es mit Myosin Va colokalisiert. Des Weiteren wurde unter diesen Kulturbedingungen eine Erhöhung der Proteinexpression der Plectin Isoform 1c beobachtet. Mittels subzellulärer Fraktionierung wurde gezeigt, dass Plectin 1c sich in der Melanosomen-Fraktion zusammen mit Myosin Va nachweisen lässt. Diese Daten weisen darauf hin, dass Plectin 1c in Melanocyten nicht nur als cytoskeletttales Protein Intermediärfilamente mit Actin Filamenten und MT verknüpft, sondern auch eine Rolle im Melanosomentransport spielen könnte.

Ein weiteres Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Interaktion von Plectin 1c mit MT genauer zu untersuchen. Vor allem sollte hier der Einfluss der Exon 1c-kodierten Sequenz auf die Interaktion der Plectin-Isoform 1c mit MT analysiert werden.

Vorangegangene Arbeiten hatten bereits gezeigt, dass die Plectin Exon 1c-kodierte Sequenz Homologie zu den MT-Bindungssequenzen von MT-assoziierten Proteinen der MAP2/Tau Proteinfamilie zeigt. Ausgehend von diesen Daten wurden biochemische Experimente durchgeführt, um zu testen, ob die Anwesenheit der Exon 1c-kodierten Sequenz die Interaktion der Plectin-Actin-Bindungsdomäne mit MT beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurden verschiedene rekombinant hergestellte Proteinfragmente der Plectin Actin-Bindungsdomäne (kodiert von den Plectin Exons 2-8) mit der Exons 1c-, bzw. der Exon 1a-kodierten Sequenz am N-Terminus, bzw. ohne diese erste Exon, in MT-Cosedimentations-experimenten miteinander verglichen. Da die Möglichkeit bestand, dass Plectin 1c eventuell auch mit Tubulin Protofilamenten interagieren könnte, wurde der Assemblierungszustand des Tubulins in den einzelnen Versuchen variiert. Diese Versuche zeigten, dass Plectin nur mit vollständig auspolymerisierten MT eine, wenngleich auch schwache, Interaktion zeigt, nicht jedoch unter Bedingungen die das Entstehen von Protofilamenten fördern. Weiters konnte gezeigt werden, dass die Präsenz sowohl der Exon 1c-, als auch der Exon 1a-kodierten Sequenz in der Actin-Bindungsdomäne zwar zu einer etwas stärkeren MT-Cosedimentation führt, dass aber zwischen den beiden Proteinfragmenten fast kein Unterschied in der Effizienz der MT-Cosedimentation zu beobachten ist. Allerdings fanden wir heraus, dass die Präsenz von zwei zusätzlichen kurzen Aminosäuresequenzen, welche ausschließlich in neuronalen Geweben durch alternatives Spleißen generiert werden, zusätzlich zur Exon 1c-kodierten Sequenz, die MT-Bindung der Plectin Actin-Bindungsdomäne deutlich verstärkt. Diese ausschließlich in neuronalem Gewebe erzeugte Kombination von Exons scheinen aus der Plectin ABD eine

funktionelle MT Bindungsdomäne zu machen und könnte somit eine Anpassung an das Cytoskelett von Neuronen (die reich an MT und Neurofilamenten sind) darstellen.

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte auffindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

6. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. DAS CYTOSKELETT IN EUKARYOTENZELLEN.	- 5 -
ABBILDUNG 2. INTERMEDIÄRFILAMENTE.	- 7 -
ABBILDUNG 3. ACTINSTrukTUREN IN DER EUKARYOTISCHEN ZELLE.	- 8 -
ABBILDUNG 4. ACTINFILAMENTE.	- 9 -
ABBILDUNG 5. MIKROTUBULI.	- 10 -
ABBILDUNG 6. DIE PLAKIN-FAMILIE.	- 12 -
ABBILDUNG 7. DOMÄNENSTRUKTUR VON PLECTIN.	- 13 -
ABBILDUNG 8. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SPLEIß-EREIGNISSE AM N-TERMINUS VON PLECTIN.	- 14 -
ABBILDUNG 9. DER MELANOSOMEN-TRANSPORTKOMPLEX.	- 17 -
ABBILDUNG 10. MYOSIN VA: STRUKTUR UND DOMÄNENMODELL.	- 18 -
ABBILDUNG 11 ZUSAMMENSETZUNG DER PA-GELE	- 22 -
ABBILDUNG 12 ZUSAMMENBAU DES BLOTSANDWICHES.	- 23 -
ABBILDUNG 13 PRIMÄRE ANTIKÖRPER WESTERN-BLOT.	- 24 -
ABBILDUNG 14 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER WESTERN-BLOT.	- 25 -
ABBILDUNG 15 ÜBERSICHT ÜBER DIE IN DEN COSEDIMENTATIONSEXPERIMENTEN VERWENDETEN PLECTIN FRAGMENTE	- 28 -
ABBILDUNG 16 PRIMÄRE ANTIKÖRPER IF-MIKROSKOPIE.	- 31 -
ABBILDUNG 17 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER IF-MIKROSKOPIE.	- 31 -
ABBILDUNG 18 SACCHAROSE GRADIENT FÜR DIE SUBZELLULÄRE FRAKTIONIERUNG.	- 34 -
ABBILDUNG 19. PLECTIN1C UND MYOSIN VA-EXPRESSION IN B16F10 ZELLEN.	- 35 -
ABBILDUNG 20. COOMASSIE-FÄRBUNG EINES 10% SDS-PA-GELS, MIT B16F10 ZELLLYSATEN, DIE UNTER VERSCHIEDENEN KULTURBEDINGUNGEN KULTIVIERT WURDEN.	- 36 -
ABBILDUNG 21. WESTERN BLOT ANALYSE DER EXPRESSION VERSCHIEDENER PLECTIN-ISOFORMEN IN B16F10 ZELLEN, DIE UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN KULTIVIERT WURDEN.	- 37 -
ABBILDUNG 22. IFM UNTER NORMALBEDINGUNGEN KULTIVierter B16F10 ZELLEN (70% KONFLUENT).	- 38 -
ABBILDUNG 23. IFM UNTER NORMALBEDINGUNGEN KULTIVierter B16F10 ZELLEN (70% KONFLUENT).	- 39 -
ABBILDUNG 24. IFM UNTER NORMALBEDINGUNGEN KULTIVierter B16F10 ZELLEN (70% KONFLUENT).	- 40 -
ABBILDUNG 25. IFM UNTER PRO-MIGRATORISCHEN BEDINGUNGEN KULTIVierter B16F10 ZELLEN (70% KONFLUENT).	- 41 -
ABBILDUNG 26. IFM UNTER PRO-MELANOGENEN BEDINGUNGEN KULTIVierter B16F10 ZELLEN (>70% KONFLUENT).	- 42 -
ABBILDUNG 27. IFM UNTER PRO-MELANOGENEN BEDINGUNGEN KULTIVierter B16F10 ZELLEN (>70% KONFLUENT).	- 43 -
ABBILDUNG 28. COOMASSIE – GEFÄRBTES 10% SDS PA-GEL BELADEN MIT PROBEN DER SUBZELLULÄREN FRAKTIONIERUNG.	- 45 -
ABBILDUNG 29. WESTERN-BLOT ANALYSE VON PROBEN DER SUBZELLULÄREN FRAKTIONIERUNG.	- 46 -
ABBILDUNG 30. SEQUENZVERGLEICH DER REPETITIVEN MT-BINDUNGSSEQUENZEN DER MT-BINDUNGSDOMÄNEN VERSCHIEDENER MAPS DER MAP2/TAU FAMILIE MIT DER VON PLECTIN EXON 1C CODIERTEN AS-SEQUENZ.	- 47 -
ABBILDUNG 31. EM VON IN VITRO POLYMERISIERTEN MT	- 48 -
ABBILDUNG 32. COSEDIMENTATION VON UNTERSCHIEDLICHEN PLECTIN-ISOFORM N-TERMINI MIT MT.	- 49 -
ABBILDUNG 33. COSEDIMENTATION VON PLECTIN (ISOFORM) ABD-PROTEINFRAGMENTEN MIT MT BEI UNTERSCHIEDLICHER ZENTRIFUGATIONSGESCHWINDIGKEIT	- 50 -
ABBILDUNG 34 COSEDIMENTATION VERSCHIEDENER PLECTIN (ISOFORM)-ABD PROTEINFRAGMENTE MIT MT.	- 51 -
	- 63 -

ABBILDUNG 35. COSEDIMENTATION VON PLECTIN-PROTEINFRAGMENTEN MIT TUBULIN-RINGEN.	- 52 -
ABBILDUNG 36. COSEDIMENTATION VERSCHIEDENER PLECTIN-ABD FRAGMENTE MIT TUBULIN.	- 53 -
ABBILDUNG 37. COSEDIMENTATION VON UNTERSCHIEDLICHEN PLECTIN-PROTEINFRAGMENTEN MIT MT.	- 55 -
ABBILDUNG 38. COSEDIMENTATION UNTERSCHIEDLICHER PLECTIN-PROTEINFRAGMENTE MIT MT	- 56 -
ABBILDUNG 39. VERGLEICH DER INTERAKTION VERSCHIEDENER PLECTIN FRAGMENTE MITTELS DENSITOMETRISCHER AUSWERTUNG VON PA-GELEN.	- 57 -
ABBILDUNG 40. MÖGLICHES MODELL DER MT – PLECTIN 1C INTERAKTION IN NEURONALEN GEWEBEN.	- 60 -

7. Referenzen

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2004. Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH Verlag 4. Auflage.
- Audesirk, Teresa und Gerald, 1999. Biology, Prentice Hall.
- Ackerl R, Walko G, Fuchs P, Fischer I, Schmuth M, Wiche G., 2007 Jul 15. Conditional targeting of Plectin in prenatal and adult mouse stratified epithelia causes keratinocyte fragility and lesional epidermal barrier defects. *J Cell Sci.* 120(Pt 14):2435-43.
- Andrä K, Nikolic B, Stöcher M, Drenckhahn D, Wiche G., 1998 Nov 1. Not just scaffolding: Plectin regulates Actin dynamics in cultured cells. *Genes Dev.* 12(21):3442-51.
- Andrä K, Lassmann H, Bittner R, Shorny S, Fässler R, Propst F, Wiche G., 1997 Dec 1. Targeted inactivation of Plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* 11(23):3143-56.
- Andrä K, Kornacker I, Jörgl A, Zörer M, Spazierer D, Fuchs P, Fischer I, Wiche G., Feb 2003. Plectin -isoform-specific rescue of hemidesmosomal defects in Plectin (-/-) keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 120(2):189-97.
- Aspengren S, Hedberg D, Sköld HN, Wallin M., 2009. New insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 272:245-302.
- Atilgan E, Wirtz D, Sun SX., 2005. Morphology of the lamellipodium and organization of Actin filaments at the leading edge of crawling cells. *Biophys J.* 89(5):3589-602.
- Bahadoran P, Busca R, Chiaverini C, Westbroek W, Lambert J, Bille K, Valony G, Fukuda M, Naeyaert JM, Ortonne JP, Ballotti R., 2003 Mar 28. Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by RAB27A missense mutations found in patients with Griscelli syndrome. *J Biol Chem.* 278(13):11386-92.
- Ballestrem Christoph, Bernhard Wehrle-Haller, Boris Hinz, and Beat A. Imhof, Sept 2000. Actin-dependent Tail Retraction Control-directed Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell*, Volume 11, 2999-3012.
- Barral DC, Seabra MC., Apr 2004. The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res.* 17(2):111-8.

- Bernier G, Mathieu M, De Repentigny Y, Vidal SM, Kothary R., 1996 Nov 15. Cloning and characterization of mouse ACF7, a novel member of the dystonin subfamily of Actin binding proteins. *Genomics*. 38(1):19-29.
- Borradori L, Sonnenberg A., Apr 1999. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol*. 112(4):411-8.
- Borisy GG, Marcum JM, Olmsted JB, Murphy DB, Johnson KA., 1975. Purification of tubulin and associated high molecular weight proteins from porcine brain and characterization of microtubule assembly in vitro. *Ann N Y Acad Sci*; 253:107-32.
- Bradford MM., 1976 Mai 7. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.
- Brokaw CJ., 1997. Mechanical components of motor enzyme function. *Biophys J*. 73(2):938-51.
- Brown A, Dalpé G, Mathieu M, Kothary R., 1995 Oct 10. Cloning and characterization of the neural isoforms of human dystonin. *Genomics*. 29(3):777-80.
- Chakraborty AK, Funasaka Y, Araki K, Horikawa T, Ichihashi M., 2003 Dec. Evidence that the small GTPase Rab8 is involved in melanosome traffic and dendrite extension in B16 melanoma cells. *Cell Tissue Res*.;314(3):381-8.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N., 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 360(6405):674-7.
- Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, Forscher P, Larson RE, Mooseker MS., 1993 Oct 8. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*. 75(1):13-23.
- Choi HJ, Park-Snyder S, Pascoe LT, Green KJ, Weis WI., Aug 2002. Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure. *Nat Struct Biol*. 9(8):612-20.
- Dehmelt Leif and Halpain Shelley, 2005. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*. 6(1): 204.
- Dessinioti C, Stratigos AJ, Rigopoulos D, Katsambas AD. A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. *Exp Dermatol*. 2009 Sep;18(9):741-9.

- Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996 Mar 14;380(6570):152-4.
- Djinovic-Carugo K, Gautel M, Ylänne J, Young P., 2002 Feb 20. The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett*. 513(1):119-23.
- Downing KH, Nogales E., 1998. New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin. *Eur Biophys J*. 27(5):431-6.
- Eger A, Stockinger A, Wiche G, Foisner R. Polarisation-dependent association of plectin with desmoplakin and the lateral submembrane skeleton in MDCK cells. *J Cell Sci*. 1997 Jun;110 (Pt 11):1307-16.
- Erber, A., Riemer, D., Bovenschulte, M., and Weber, K., 1998. Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J. Mol. Evol*. 47: 751–762.
- Espindola FS, Suter DM, Partata LB, Cao T, Wolenski JS, Cheney RE, King SM, Mooseker MS., Dec 2000. The light chain composition of chicken brain Myosin Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motil Cytoskeleton*. 47(4):269-81.
- Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS., Dec 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol*. 119(6):1541-57.
- Fidler IJ., 1973 Apr 4. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol*.;242(118):148-9.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, McGrath JA, Mellerio JE, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Vahlquist A, Woodley D, Zambruno G. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Jun;58(6):931-50.
- Foisner R, Wiche G., 1987 Dec 5. Structure and hydrodynamic properties of Plectin molecules. *J Mol Biol*. 198(3):515-31.
- Fontao L, Favre B, Riou S, Geerts D, Jaunin F, Saurat JH, Green KJ, Sonnenberg A, Borradori L., 2003 May. Interaction of the bullous pemphigoid antigen 1 (BP230) and desmoplakin with intermediate

- filaments is mediated by distinct sequences within their COOH terminus. *Mol Biol Cell*. 14(5):1978-92.
- Foth Bernardo J., Goedecke Marc C., and Soldati Dominique, 2006 Mar 7. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(10): 3681–3686.
- Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K., 1978. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. ;75(10):5034-8.
- Fuchs, E. & Weber, K., 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 345–382.
- Fuchs E, Yang Y, Dowling J, Kouklis P, Smith E, Guo L, Yu QC., 1997. Intermediate filament linker proteins. *Soc Gen Physiol Ser*. 52:141-8.
- Fuchs E, Yang Y., 1999 Sep 3. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell*. 98(5):547-50.
- Fuchs P, Zörer M, Rezniczek GA, Spazierer D, Oehler S, Castañón MJ, Hauptmann R, Wiche G., Dec 1999. Unusual 5' transcript complexity of Plectin isoforms: novel tissue-specific exons modulate Actin binding activity. *Hum Mol Genet*. 8(13):2461-72.
- Fukuda M, Kuroda TS, Mikoshiba K. Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):12432-6.
- Georgakopoulou, S., Möller, D., Sachs, N., Herrmann, H., and Aebi, U., 2009. Near-UV circular dichroism reveals structural transitions of vimentin subunits during intermediate filament assembly. *J. Mol. Biol.* 386:544–553.
- Gross SP, Tuma MC, Deacon SW, Serpinskaya AS, Reilein AR, Gelfand VI., 2002 Mar 4., Epub 2002 Feb 25. Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus* melanophores. *J Cell Biol*. 156(5):855-65.
- Halpain Shelley and Dehmelt Leif, 2006. Protein family review. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology* 7:224.
- Herrmann H, Wiche G., 1987 Jan 25. Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J Biol Chem*. 262(3):1320-5.
- Herrmann, H., and Aebi, U., 1998. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:177–185.

- Herrmann H., Sergei V. Strelkov, Peter Burkhard, and Ueli Aebi, 2009. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 119 Number 07.
- Hirokawa N, Hisanaga S, Shiomura Y. Aug. 1988 MAP2 is a component of crossbridges between microtubules and neurofilaments in the neuronal cytoskeleton: quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy and reconstitution studies. *J Neurosci.*; 8(8):2769-79.
- Hotulainen P, Lappalainen P., 2006. Stress fibers are generated by two distinct Actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol.* 173(3):383-94.
- Houseweart, M.K., and Cleveland, D.W., 1998. Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:93–101.
- Hume AN, Tarafder AK, Ramalho JS, Sviderskaya EV, Seabra MC. A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes. *Mol Biol Cell.* 2006 Nov;17(11):4720-35. Epub 2006 Aug 16.
- Ishikawa, H., Bischoff, R., and Holtzer, H., 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 38: 538–555.
- Izumi T, Gomi H, Kasai K, Mizutani S, Torii S., 2003 Oct. The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. *Cell Struct Funct.*;28(5):465-74.
- Janda L, Damborský J, Rezniczek GA, Wiche G. 2001 Nov;23. Plectin repeats and modules: strategic cysteines and their presumed impact on cytolinker functions. *Bioessays.* (11):1064-9.
- Jefferson Julius J., Conrad L. Leung & Ronald K. H. Liem, 2004. Plakins: Goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 542-553.
- Jefferson JJ, Ciatto C, Shapiro L, Liem RK, 2007. Structural analysis of the plakin domain of bullous pemphigoid antigen1 (BPAG1) suggests that plakins are members of the spectrin superfamily. *J Molec Biol* 366:244–257.
- Kirmse R, Portet S, Mücke N, Aebi U, Herrmann H, Langowski J., 2007. A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin. *J Biol Chem.* Jun 22;282(25):18563-72.

- Kölsch Anne, Reinhard Windoffer, and Rudolf E. Leube, 2009. Actin-Dependent Dynamics of Keratin Filament Precursors. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66: 976–985.
- Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeöld A, Fischer I, Paulin D, Schröder R, Wiche G., 2008 Mai 19. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J Cell Biol.*;181(4):667-81.
- Koss-Harnes D, Høyheim B, Anton-Lamprecht I, Gjesti A, Jørgensen RS, Jahnsen FL, Olaisen B, Wiche G, Gedde-Dahl T Jr., Jan 2002. A site-specific Plectin mutation causes dominant epidermolysis bullosa simplex Ogna: two identical de novo mutations. *J Invest Dermatol.* 118(1):87-93.
- Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. 2003 Jan 15 Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin $\alpha 6 \beta 4$ important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci.*;116(Pt 2):387-99.
- Lang T, Wacker I, Wunderlich I, Rohrbach A, Giese G, Soldati T, Almers W., 2000. Role of Actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys J.* 78(6):2863-77.
- Langford GM., Dec 2002. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic.* 3(12):859-65.
- Larson SM, Davidson AR., Nov 2000. The identification of conserved interactions within the SH3 domain by alignment of sequences and structures. *Protein Sci.* 9(11):2170-80.
- Lazarides E, Burridge K., 1975. Alpha-Actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell.* 6(3):289-98.
- Leung Conrad L., Kathleen J. Green and Ronald K. H. Liem, 2002 Jan. 1. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends in Cell Biology* Volume 12, Issue 1, Pages 37-45.
- Lionne C, Buss F, Hodge T, Ihrke G, Kendrick-Jones J., 2001. Localization of myosin Va is dependent on the cytoskeletal organization in the cell. *Biochem Cell Biol.* 79(1):93-106.
- Ménasché G, Ho CH, Sanal O, Feldmann J, Tezcan I, Ersoy F, Houdusse A, Fischer A, de Saint Basile G. Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(3):450-6.

- Mercer JA, Seperack PK, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA., 1991 Feb 21. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*. 349(6311):709-13.
- Mehta AD, Rock RS, Rief M, Spudich JA, Mooseker MS, Cheney RE., 1999 Aug 5. Myosin-V is a processive Actin-based motor. *Nature*. 400(6744):590-3.
- Mehta A., Jun 2001 Myosin learns to walk. *J Cell Sci*. 114(Pt 11):1981-98.
- Nagashima K, Torii S, Yi Z, Igarashi M, Okamoto K, Takeuchi T, Izumi T. Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions. *FEBS Lett*. 2002 Apr 24;517(1-3):233-8.
- Nascimento Alexandra A.C., Rita G. Amaral, Joao C.S. Bizario, Roy E. Larson, and Enilza M. Espereafico, Oct 1997. Subcellular Localization of Myosin-V in the B16 Melanoma Cells, a Wild-type Cell Line for the dilute Gene. *Molecular Biology of the Cell*, Volume 8, 1971-1988.
- Nikolic B, Mac Nulty E, Mir B, Wiche G., Sep 1996. Basic amino acid residue cluster within nuclear targeting sequence motif is essential for cytoplasmic Plectin -vimentin network junctions. *J Cell Biol*. 134(6):1455-67.
- Ozer RS, Halpain S., 2000. Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the Actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 11(10):3573-87.
- Passeron T, Bahadoran P, Bertolotto C, Chiaverini C, Buscà R, Valony G, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R., 2004 Jun. Cyclic AMP promotes a peripheral distribution of melanosomes and stimulates melanophilin/Slac2-a and Actin association. *FASEB J*.;18(9):989-91.
- Pellegrin S, Mellor H., 2007. Actin stress fibres. *J Cell Sci*. 120(Pt 20):3491-9.
- Pfendner E, Uitto J., Jan 2005. Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Invest Dermatol*. 124(1):111-5.
- Pfendner E, Rouan F, Uitto J., 2005 Progress in epidermolysis bullosa: the phenotypic spectrum of Plectin mutations *Experimental Dermatology* 14: 241–249
- Pytela R, Wiche G., Aug 1980. High molecular weight polypeptides (270,000-340,000) from cultured cells are related to hog brain microtubule-associated proteins but copurify with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(8):4808-12.

- Raposo G, Marks MS., Oct 2007 Melanosomes-dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(10):786-97.
- Revenu Céline, Rafika Athman, Sylvie Robine and Daniel Louvard, 2004. The Co-Workers of Actin Filaments: From Cell Structures to Signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Volume 5.
- Rezniczek GA, de Pereda JM, Reipert S, Wiche G. 1998 Apr 6. Linking integrin $\alpha 6 \beta 4$ -based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the $\beta 4$ subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol.* ;141(1):209-25.
- Rezniczek GA, Abrahamsberg C, Fuchs P, Spazierer D, Wiche G., 2003 Dec 1. Plectin 5'-transcript diversity: short alternative sequences determine stability of gene products, initiation of translation and subcellular localization of isoforms. *Hum Mol Genet.* 12(23):3181-94.
- Rezniczek GA, Walko G, Wiche G. 2010 Jan Plectin gene defects lead to various forms of epidermolysis bullosa simplex. *Dermatol Clin.* ;28(1):33-41.
- Rief M, Rock RS, Mehta AD, Mooseker MS, Cheney RE, Spudich JA., 2000 Aug 15. Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(17):9482-6.
- Ruhrberg C, Watt FM., Jun 1997. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet Dev.* 7(3):392-7.
- Schott D, Ho J, Pruyne D, Bretscher A., 1999 Nov 15. The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J Cell Biol.* 147(4):791-808.
- Seiji, M., Shima, K., Birbeck, M.S.C., and Fitzpatrick, T.B., 1963. Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 100, 497-533.
- Seyun Kim and Pierre A. Coulombe, 2007. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* 21: 1581-1597.
- Small J.Victor, Theresia Stradal, Emmanuel Vignal and Klemens Rottner, 2002. The lamellipodium: where motility begins. *TRENDS in Cell Biology* Vol.12 No.3.
- Sonnenberg Arnoud, Ana M. Rojas and José M. de Pereda, 2007 Mai 18. The Structure of a Tandem Pair of Spectrin Repeats of Plectin Reveals a Modular Organization of the Plakin Domain. *Journal of Molecular Biology*, Volume 368, Issue 5, Pages 1379-1391.

- Sonnenberg A, Liem RK., 2007 Jun 10, Epub 2007 Apr 19. Plakins in development and disease. *Exp Cell Res.* 313(10):2189-203.
- Sun D, Leung CL, Liem RK., Jan 2001. Characterization of the microtubule binding domain of microtubule Actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J Cell Sci.* 114(Pt 1):161-172.
- Tolmachova, T., J.S. Ramalho, J.S. Anant, R.A. Schultz, C.M. Huxley, and M.C. Seabra. 1999. Cloning, mapping and characterization of the human RAB27A gene. *Gene.* 239:109–116.
- Veigel C, Wang F, Bartoo ML, Sellers JR, Molloy JE., Jan 2002. The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol.* 4(1):59-65.
- Wasmeier C, Hume AN, Bolasco G, Seabra MC., 2008 Dec 15. Melanosomes at a glance. *J Cell Sci.* 121(Pt 24):3995-9.
- Wegner A., 1976. Head to tail polymerization of Actin. *J Mol Biol* 108: 139–150.
- Werner Nicola Susann, Reinhard Windoffer, Pavel Strnad, Christine Grund, Rudolf Eberhard Leube, and Thomas Michael Magin, 2004. Epidermolysis Bullosa Simplex-Type Mutations Alter the Dynamics of the Keratin Cytoskeleton and Reveal a Contribution of Actin to the Transport of Keratin Subunits. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 15, 990–1002.
- Wiche G, Krepler R, Artlieb U, Pytela R, Aberer W., 1984 Nov. Identification of Plectin in different human cell types and immunolocalization at epithelial basal cell surface membranes. *Exp Cell Res.*;155(1):43-9.
- Wiche G, Becker B, Lubert K, Weitzer G, Castañon MJ, Hauptmann R, Stratowa C, Stewart M., Jul 1991. Cloning and sequencing of rat Plectin indicates a 466-kD polypeptide chain with a three-domain structure based on a central alpha-helical coiled-coil. *J Cell Biol.* 114(1):83-99.
- Wiche Gerhard, 1998. Role of Plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *Journal of Cell Science* 111, 2477-2486.
- Wu C., 2007 Jan. Focal adhesion: a focal point in current cell biology and molecular medicine. *Cell Adh Migr.*;1(1):13-8.
- Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JA 3rd., 1998 Dec 28. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J Cell Biol.* 143(7):1899-918.

- Yang Y, Bauer C, Strasser G, Wollman R, Julien JP, Fuchs E., 1999 Jul 23. Integrators of the cytoskeleton that stabilize microtubules. *Cell*. 98(2):229-38.
- Zamir E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Katz BZ, Lin S, Lin DC, Bershadsky A, Kam Z, Geiger B., 2000 Apr. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol.*;2(4):191-6.
- Zamora-Leon SP, Lee G, Davies P, Shafit-Zagardo B., 2001 Oct 26, Epub 2001 Aug 23. Binding of Fyn to MAP-2c through an SH3 binding domain. Regulation of the interaction by ERK2. *J Biol Chem*. 276(43):39950-8.

8. Abkürzungen

ABD Actin-Bindungsdomäne
ATP Guanosintriphosphat
BCIP 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
cAMP Cyclisches Adenosinmonophosphat
CH Calponin-Homologie
DEB Dystrophische EB
DMF Dimethylformamid
EB Epidermolysis bullosa
EBS Edermolysis bullosa simplex
EBS-MD Edermolysis bullosa mit muskulärer Dystrophie
EBS-PA Edermolysis bullosa mit Pylorus-Atresie
EM Elektronenmikroskop
GFAP Saures Glialfaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
GST Glutathion-S-Transferase
GTP Guanosintriphosphat
HIS Histidin
HMW High Molecular Weight
IBMX 3-Isobutyl-1-methylxanthin
IF Intermediärfilament(e)
JEB Epidermolysis bullosa junctionalis
LGF Großgranuläre Fraktion (large granular fraction)
LMW Low Molecular Weight
Ln1 Laminin 1
MAPs Mikrotubuli assoziierte Proteine
MSH Melanocyten-stimulierendes-Hormon
MT Mikrotubuli
MTOC Mikrotubuli organisierendes Zentrum (microtubule organizing center)
NBT Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
PMA Phorbol 12-myristat 13-acetat
PA PolyAcrylamid
SDS Natrium-Lauryl-Sulfat (Sodium-Dodecyl-Sulfate)

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Alexander Ertl
Telefon: 0650/ 54 89 261
E – Mail: alexander_ertl@aon.at

Geburtsdatum: 13.11.1978
Nationalität: Österreich

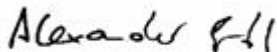
Praktische Erfahrung: 07-09 2003 Praktikum am Institut für Molekulare Zellbiologie
2004 – 2005 Geringfügig beschäftigt bei Hexal Pharma AG
WS 2005/06 Angestellter der Universität Wien
Seit 2007 Angestellter der AGES PharmMed

Präsenzdienst: 28.07.1997 – 27.03.1998

Schulbildung: seit 1998 Biologiestudium (Genetik) an der
Universität Wien
1993 – 1997 BG und BRG Wien III Oberstufenrealgymnasium
1989 – 1993 BG und BRG Wien III

Sonstige Kompetenzen:

Sprachen: Deutsch (Muttersprache)
 Englisch
EDV: MS Excel, MS Word, MS Powerpoint, SQL
 Adobe Photoshop, Adobe Illustrator
Führerschein: Gruppe B



Alexander Ertl